



Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular



Análisis de la especificación de las neuronas Va en la Cuerda Nerviosa Ventral de *Drosophila melanogaster*

Memoria de Tesis doctoral
Hugo Gabilondo Olmedo

Madrid, 2014

Departamento de Biología Molecular,
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid



**Análisis de la especificación de las neuronas Va en
la Cuerda Nerviosa Ventral de *Drosophila*
*melanogaster***

Memoria de Tesis doctoral presentada por
Hugo Gabilondo Olmedo
Licenciado en Biología
Para optar al grado de Doctor en Ciencias por la
Universidad Autónoma de Madrid
Madrid, 2014

Director de Tesis:
Jonathan Benito Sipos

D. Jonathan Benito Sipos, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencia, de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada: ‘Análisis de la especificación de las neuronas Va en la Cuerda Nerviosa Ventral de *Drosophila melanogaster*’, de la que es autor el licenciado en Biología por la UAM, D. HUGO GABILONDO OLMEDO, ha sido realizada en las dependencias de la Unidad de Fisiología Animal (Dpto. de Biología) de la Facultad de Ciencias.

Firmo el presente certificado, autorizando su presentación como director de la mencionada tesis doctoral.

En Madrid a 4 de mayo de 2014.

Fdo: Jonathan Benito Sipos

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a Jonathan Benito, Jony, por haberse convertido mi “padre científico”. Sus enseñanzas y su estímulo me han impulsado y me han abierto horizontes en estos años. Mi gratitud hacia él no se limita a su inestimable ayuda en la realización de esta tesis. Los buenos momentos juntos son muchísimos, pero no olvidaré las conversaciones sobre fútbol y ciclismo en los pasillos de la universidad, ni las interminables charlas dedicadas a hablar de Ciencia mientras montábamos juntos en bicicleta. Nuestra amistad empezó antes de esta Tesis, y obviamente no termina con este texto. Gracias director, gracias amigo.

Quiero expresar también mi agradecimiento a Laura Torroja, a Inmaculada Canal y a Marta Magariños por ser las primeras en despertar mi interés por la Investigación en el Laboratorio Avanzado de Fisiología Animal. Son un ejemplo de cómo se puede ser un buen profesor, a la vez que una persona cercana y amable. Desde entonces mi interés por la Investigación no ha dejado de crecer, igual que mi cariño y gratitud hacia ellas.

Quiero agradecer al resto de la Unidad de Fisiología Animal los buenos consejos y enseñanzas, tanto en el ámbito de la Investigación como en el de la Docencia. Gracias a Isabel Molina y a Yolanda León por su orientación, sus sugerencias y su estímulo como docentes. He aprendido y disfrutado mucho compartiendo mis clases con ellas.

La Ciencia me ha premiado en muchos aspectos, pero desde luego destaco el hecho de haberme permitido conocer a mis compañeros. Nacho, María, Arturo, Ali, Bego, Marta, Delia, Turi, Miguel y Toño. Gracias por los más que buenos momentos vividos juntos en este laboratorio y fuera de él, por hacerme venir a trabajar alegre, o sacarme una sonrisa cuando no era mi día. La Ciencia nos hizo amigos, y los malos tiempos que corren para la Investigación, que nos han dispersado por laboratorios de todo el mundo, no conseguirán que dejemos de serlo.

Por razones de otro tipo, debo expresar mi agradecimiento a:

A mis padres, Angel y Paloma, y a mi hermano Román. Gracias por estar ahí, en todo momento, por quererme y cuidarme siempre, hasta cuando no me daba cuenta. Sé que no hace falta decirlo y que no tiene cabida en “Agradecimientos”, pero además de estar muy agradecido, os quiero mucho.

A mi tía Carmen, por su tremenda generosidad y por la ayuda que me ha prestado siempre.

A mis amigos, por ser la válvula de escape de mis frustraciones científicas.

Muy especialmente quiero darle las gracias a Marta, mi compañera durante tantos años. Gracias por estar a mi lado, y estarlo tan cerca. Muchas gracias por quererme, por ayudarme, por transmitirme su alegría, por conocerme mejor que nadie y comprenderme mejor que yo. Gracias por ser todo lo que eres en mi vida.

Indice

GLOSARIO	14
RESUMEN.....	16
SUMMARY	20
 INTRODUCCIÓN	 24
1. <i>Drosophila melanogaster</i> , modelo de estudio de la Biología del Desarrollo y la Genética.	26
2. El Sistema Nervioso Central de <i>Drosophila melanogaster</i>	27
3. Desarrollo de la CNV.	28
3.1 Creación de los NB a partir del neuroectodermo, y adquisición de su identidad espacial.....	28
3.2 Los genes Hox y su implicación en la diferenciación a lo largo del eje A-P.....	29
3.3 Del NB a la célula post-mitótica.	32
3.4 Especificación de identidades únicas.	37
4. El neuropéptido Capability como marcador para el estudio de la especificación neuronal. .	38
 OBJETIVOS	 40
 MATERIAL Y MÉTODOS	 44
1. Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i>	46
2. Sistema <i>UAS-GAL4</i>	49
3. Cromosomas balanceadores.....	50
4. Técnicas de Inmunohistoquímica.....	51
5. Obtención y análisis de imágenes de microscopía óptica.....	53
6. Análisis estadístico de los datos.....	53
 RESULTADOS	 54
 APARTADO I DE RESULTADOS: ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CAPA EN	
<i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>.....	56
1.1 Caracterización del patrón de expresión del neuropéptido Capa en la Cuerda Nerviosa Ventral (CNV) de <i>Drosophila melanogaster</i>	56
1.2 Identificación del neuroblasto progenitor de las células Va-Capa.....	58

1.3 Identificación de los genes temporales implicados en la especificación de las células Va-Capa.....	60
1.4 Neuronas Va-Capa y muerte celular programada.....	62
1.5 Implicación de la ruta de Noth en la especificación de las células Va-Capa.	64
1.6 Identificación de otros genes requeridos para la especificación de las neuronas Va-Capa.	66
1.7 Transporte retrógrado y la ruta BMP en las Neuronas Va-Capa.....	67
APARTADO II DE RESULTADOS: EL SISTEMA DE NEURONAS HOMÓLOGAS VA.....	70
2.1 El neuropéptido Capa dentro del sistema Va.....	70
2.2 La neurona Va-A1 es peptidérgica y expresa los neuropéptidos DH31 y Ast-A.....	71
2.3 Las Va son una serie de neuronas homólogas.	73
APARTADO III DE RESULTADOS: LA ACCIÓN DE LOS GENES HOX EN EL NUEVO SISTEMA DE NEURONAS VA.	75
3.1 Los diferentes procesos de especificación de las neuronas Va a lo largo del eje A-P son dirigido por la acción de los genes Hox.....	75
3.2 <i>Ubx</i> dirige la diferenciación específica de segmento de la neurona Va-DH31.	76
3.3 Altos niveles de Antp enmascaran la función de <i>Ubx</i> en T3, pero no modifican su expresión.....	78
3.4 Altos niveles de Antp modifican la función de <i>abd-A</i> en las neuronas Va-Capa, pero no modifican su expresión.	80
3.5 Altos niveles de expresión de <i>abd-A</i> pueden producir especificación del destino Va-Capa tanto en segmentos torácicos, como en los abdominales posteriores	82
APARTADO IV DE RESULTADOS: NUEVOS GENES IMPLICADOS EN EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CAPA.....	85
4.1 <i>scribbler</i> y <i>dachshund</i> son necesarios para la muerte celular programada dependiente de Abd-B en las neuronas Va posteriores.	85
4.2 Klumpfuss desempeña un nuevo papel en el proceso de especificación de Capa.	89
4.3 <i>klumpfuss</i> es necesario, pero no suficiente, para producir la muerte celular programada de la neuronas hermanas de las Va-Capa	91
4.4 <i>klumpfuss</i> parece ejercer su función en la CMG progenitora de las neuronas Va-Capa. .	92
4.5 <i>klu</i> no actúa como un transductor de la Ruta de señalización de Notch en la división asimétrica de la CMG.	94

DISCUSIÓN	96
1. Las células Va son generadas a partir del NB 5-3, en una ventana temporal Cas.	98
2. El papel de la muerte celular programada en la determinación del patrón de expresión de las neuronas Va.	99
3. El <i>screening</i> genético dirigido es un método eficiente para el estudio de destinos neurales.	101
4. Las neuronas Va adquieren 4 destinos celulares diferentes a lo largo del eje A-P, 2 de los cuales son peptidérgicos.	102
5. El Sistema Va permite el estudio detallado de las relaciones establecidas entre los genes Hox.	103
6. Un nuevo mecanismo de diversidad neural segmental producido por los genes Hox.	105
7. El papel de <i>sbb</i> y <i>dac</i> resulta esencial en la MCP de las neuronas Va-Capa de los segmentos A5-A6 inducida por Abd-B.	106
8. <i>klu</i> y la ruta de Notch en la división asimétrica de la CMG progenitora de las neuronas Va-Capa.	108
9. El papel de <i>klu</i> en las neuronas Va-Capa: diferente mecanismo pero similar objetivo.	109
 CONCLUSIONES	 110
CONCLUSIONS	114
 BIBLIOGRAFÍA.....	 116
 ANEXO I	 128
ANEXO II	132

GLOSARIO

abd-A: *abdominal-A*

Abd-B: *Abdominal-B*

Antp: *Antennapedia*

A-P: eje Antero Posterior

Ast-A: Alatostatina-A

BMP: “Bone Morphogenetic Proteins”

capa: *capability*

cas: *castor*

CMG: Célula Madre Ganglionar

CNV: Cuerda Nerviosa Ventral

D-V: eje Dorso-Ventral

dac: *dachshund*

DH-31: Hormona Diurética 31

dim: *dimmed*

en: *engrailed*

fMRFa: *fMRFamida*

GFP: “Green Fluorescent Protein”

grh: *grainyhead*

gsb: *gooseberry*

hb: *hunchback*

hkb: *huckebein*

klu: *klumpfuss*

kr: *krüppel*

lbe: *ladybird*

Lk: Leucoquinina

MCP: Muerte celular Programada

mir: *mirror*

NB: neuroblasto

Np: neuropéptidos

Nplp1: “Neuropeptide-like precursor 1”

ONH: Órgano neurohemal

PBS: Tampón fosfato salino

PBT: PBS con Tween

pdm: *pdm1-pdm2*

pMad: Mad fosforilado

Pros: Prospero

sbb: *scribbler*

SNC: Sistema Nervioso Central

UAS: “Upstream Activating Sequences”

Ubx: *Ultrabithorax*

wor: *worniu*

RESUMEN

Resumen

Durante el desarrollo embrionario, cada una de las células originadas a partir de los progenitores neurales, conocidos como neuroblastos (NB), adquiere un destino celular concreto que responde a diferentes requerimientos funcionales y estructurales, como los establecidos a lo largo del eje Antero-Posterior (A-P) del individuo. La familia de genes Hox interviene de manera decisiva en el desarrollo de las estructuras morfológicamente diferentes encontradas a lo largo del eje A-P, incluyendo la diferenciación de los linajes de NBs.

Para profundizar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en este proceso, se ha estudiado el desarrollo del sistema de neuronas Va, una serie de neuronas homologas creadas por NBs homólogos en segmentos diferentes. Dichas neuronas se originan en estadios tempranos en todos los segmentos de la Cuerda Nerviosa Ventral (CNV) como neuronas equivalentes, pero posteriormente sufren 4 procesos de especificación distintos determinados por la acción, aparentemente post-mitótica, de los genes Hox. La actuación de *Abd-B* provoca la apoptosis de las neuronas de los segmentos A5-A7. En los segmentos torácicos, las neuronas dejan de ser localizables a partir de estadio 15 tardío, y *Antp* determina su destino desconocido. Las neuronas Va de los segmentos A2-A4 expresan el neuropéptido Capability (Capa) (Va-Capa) bajo la influencia del gen *abd-A*, mientras que *Ubx* determina la expresión de Alarostatina-A (Ast-A) y la Hormona Diurética 31 (DH31) en el segmento A1 (Va-DH31). Se trata por tanto del primer caso en el que la acción de los genes Hox determina 4 destinos celulares diferentes a partir de una serie de neuronas homólogas, 2 de los cuales resultan ser destinos peptidérgicos.

Para finalizar, se ha llevado a cabo un *screening* genético en el que se han identificado varios genes implicados en la correcta especificación de las neuronas Va-Capa. Entre ellos se encuentran *scribbler* (*sbb*) y *dachshund* (*dac*), que resultan imprescindibles para la muerte celular dirigida por *Abd-B* de las neuronas Va de los segmentos A5-A6. Además, se describe cómo el factor de transcripción Klumpfuss resulta esencial en el proceso de división asimétrica de la Célula Madre Ganglionar (CMG), diferenciando el destino de las neuronas Va que expresan Capa (Va-Capa) y del de sus neuronas hermanas que sufren apoptosis. En mutantes *klu*, se producen dos neuronas de tipo Notch-OFF, que expresan Capa, en vez de una de tipo Notch-OFF y otra Notch-ON.

Además de incrementar el conocimiento sobre los procesos de especificación neural, a través de esta tesis se ha perfilado el sistema de las neuronas Va como un valioso modelo con el que llevar a cabo futuras investigaciones sobre importantes aspectos del desarrollo de la CNV de *Drosophila*.

SUMMARY

During embryogenesis, cells of the Central Nervous System (SNC) are generated from neural progenitors, called neuroblasts (NB). Different functional and structural requirements, as those found along the anteroposterior axis (A-P) of the individual, are endowed by specific cellular fates acquired by each neuron. The Hox gene family plays a key role in the development of morphologically distinct structures along the A-P axis, including the differentiation of diverse NBs lineages.

To gain insights into the underlying mechanisms involved in this process, this thesis focuses on the Va neuronal system, which includes a series of homologous neurons which originate from homologous NBs at different segments of the Ventral Nerve Cord (CNV). Initially, during the early stages of the development, these neurons appear in all segments as equivalent cells, but subsequently undergo 4 different specification processes, determined by the action of the Hox genes through apparently post-mitotic mechanisms. In this scenario, the *Abdominal-B gene* (*Abd-B*) induces apoptosis in the A5 -A7 segments. The Va neurons in the thoracic segments cannot be traced from late stage 15 onwards, and *Antp* gene determines its unknown fate. The Va neurons in the A2 -A4 segments express the neuropeptide Capability (Capa; Va-Capa neurons) under the *abd-A* gene influence, whereas Allatostatine -A (Ast -A) and Diuretic Hormone 31 (DH31; Va-DH31 neurons) are expressed in the A1 segment due to the action of *Ubx*. Thus, this system represents the first case in which the action of Hox genes determines 4 different cell fates from a series of homologous neurons, 2 of which are peptidergic.

Furthermore, a targeted genetic *screening* was conducted to identify genes involved in the specification of Va- Capa neurons. Among the candidate genes, *scribbler* (*sbb*) and *dachshund* (*dac*) were shown to be essential for the programmed cell death triggered by *Abd-B* in the A5-A6 segments. In addition, the transcription factor Klumpfuss was identified as an essential element in the asymmetric division of the Ganglion Mother Cell (GMC), acting to differentiate between the Va-Capa neurons and their siblings, which undergo apoptosis. This role of Klumpfuss explains why *klu* mutants exhibit two Notch-OFF type neurons, which express Capa, instead of one Notch-OFF and its respective Notch-ON sibling cell.

Beyond increasing the knowledge about the process of neural specification, this thesis has portrayed the Va neuronal system as a valuable model to explore important aspects of the development of the CNV in *Drosophila*.

INTRODUCCIÓN

1. *Drosophila melanogaster*, modelo de estudio de la Biología del Desarrollo y la Genética.

Desde hace más de 100 años *Drosophila melanogaster* se sitúa a la vanguardia como modelo de la Biología, desde que Thomas Hunt Morgan en 1908 observó una mutación que hacía faltar la pigmentación al ojo de la mosca. Fue a partir de este descubrimiento cuando, junto a otros colegas como Bridges, Sturtevant y Muller, pudo continuar la teoría de la herencia Mendeliana, otorgando el papel de portador del material genético a los cromosomas, y dando a conocer a *D.melanogaster* como un modelo idóneo para el estudio genético y del desarrollo en general (revisado por Nichols, 2006). Muchas son las características que propician este hecho:

Su ciclo de vida reproductivo es corto, ya que el tiempo que transcurre desde que un huevo se transforma en un nuevo individuo adulto es de tan solo 10 días a una temperatura de 25°C. La hembra es capaz de poner huevos tan solo 12 horas después de su nacimiento como mosca adulta, y puede depositar cientos de ellos en pocos días. Este corto periodo de gestación y el gran número de progenie que produce, hace posible el análisis de miles de mutantes en cuestión de semanas.

Además, su pequeño tamaño permite el almacenamiento de grandes poblaciones en poco espacio, y por tanto su mantenimiento es fácil y económico.

Uno de los aspectos más interesantes de los modelos genéticos como *Drosophila* es el tamaño relativamente pequeño de su genoma, al que se le presupone un contenido de no más de 14.000 genes codificantes (Celniker y Rubin, 2003), en comparación con los cerca de 25.000 calculados para el genoma humano. Sin embargo, resulta especialmente interesante que, siendo un animal tan diferente al humano, los procesos moleculares básicos por los cuales se genera una mosca sean tan parecidos a los que generan un ser humano (se estima que más del 60% de los genes humanos tiene ortólogos funcionales en *Drosophila*; revisado por (Bernards y Hariharan, 2001). Esta sencillez se refleja también en el número de cromosomas que presenta: tan solo 4 pares.

Gran variedad de herramientas genéticas han sido desarrolladas para *Drosophila*, pero seguramente es la posibilidad de crear fácilmente animales transgénicos y llevar a cabo *screening* de mutantes a gran escala lo que hacen de *Drosophila* uno de los modelos más potentes (revisado por Nichols, 2006).

Además de las técnicas básicas de transgénicos, se han desarrollado también avanzados sistemas como el *Gal4-UAS* que permiten controlar la expresión tanto a nivel temporal como espacial de los genes que le interesen al investigador, incluyendo marcadores como lacZ o GFP (Brand y Perrimon, 1993).

2. El Sistema Nervioso Central de *Drosophila melanogaster*.

La inmensa capacidad del Sistema Nervioso Central (SNC) para procesar información se sustenta en su complejidad estructural y en la amplia diversidad de tipos celulares que lo componen, que es, de lejos, la mayor dentro de los distintos órganos animales (Urbach y Technau, 2004). Se estima que el cerebro humano contiene unos 100.000 millones de neuronas, cada una de las cuales forma, de media, entre 1.000 y 10.000 contactos sinápticos (Muotri y Gage, 2006). Además, estas neuronas distan de ser equivalentes, ya que existen al menos 10.000 tipos celulares diferentes en el SNC humano (Muotri y Gage, 2006). Por tanto, una de las preocupaciones fundamentales de la Biología del Desarrollo y la Neurociencia es entender los mecanismos y procesos por los cuales se establece, durante el desarrollo embrionario, esta enorme diversidad celular.

Debido a su relativa sencillez y la gran variedad de técnicas moleculares y genéticas disponibles, el estudio del SNC de *Drosophila* ha resultado crucial para estudiar y empezar a comprender algunos de estos procesos. El SNC de *Drosophila* se divide en cerebro y Cuerda Nerviosa Ventral (CNV). Hasta la fecha, la CNV (homóloga a la médula espinal de mamíferos) ha sido el modelo principal para los estudios de desarrollo debido a su relativa sencillez respecto al cerebro. Una de las características que motivan este hecho es que la CNV está formada por la repetición de unidades muy parecidas, que son modificadas a lo largo del eje Antero Posterior (A-P) para llevar a cabo diferentes funciones. A cada una de estas unidades funcionales y anatómicas que se repiten, se las conoce con el nombre de neurómero, que a su vez se divide en dos hemineurómeros simétricos (revisado por Benito-Sipos, 2013).

3. Desarrollo de la CNV.

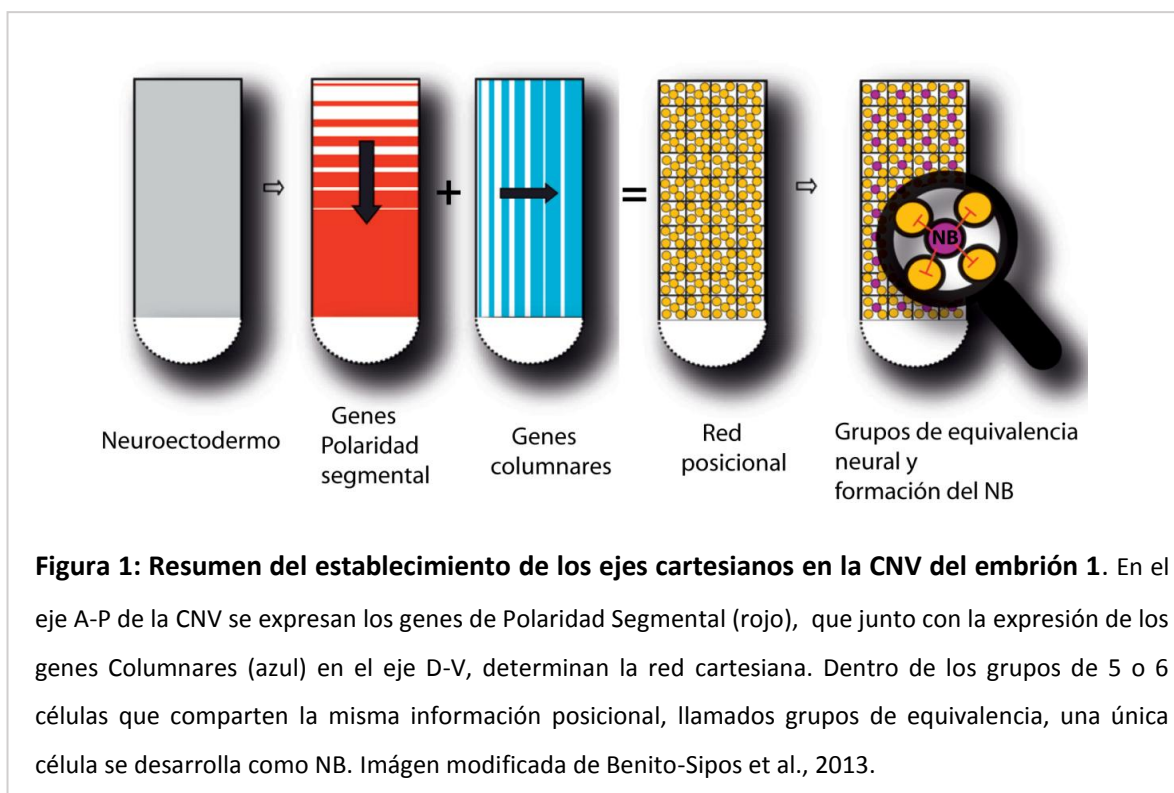
3.1 Creación de los NB a partir del neuroectodermo, y adquisición de su identidad espacial.

La CNV deriva del neuroectodermo, una lámina unicelular localizada ventro-lateralmente en el embrión temprano, y caracterizada por la expresión de los llamados genes proneurales (Bossing et al., 1996; Skeath y Doe, 1996). Igual que ocurre en el resto del embrión temprano, el neuroectodermo sufre un proceso de compartimentación, que se inicia con la formación de los ejes A-P y Dorso-Ventral (D-V) que son definidos por la expresión gradual de diferentes genes. En el eje A-P resulta fundamental la expresión de los genes segmentales, cuya expresión viene previamente determinada por la acción de los genes de efecto materno, los genes “*gap*” y los genes “*pair rule*”. En el caso del eje D-V, es finalmente la expresión gradual de los genes columnares la que determina las coordenadas del eje (Urbach y Technau, 2008). La expresión de estos genes a lo largo de ambos ejes, subdivide a cada hemineurómero en un sistema de coordenadas cartesianas (Maurange y Gould, 2005). En esta red, existen grupos de 5 o 6 células que compartirán la misma información posicional, es decir, que muestran la misma expresión de genes columnares y segmentales. A estos grupos de células se les conoce con el nombre de grupos de equivalencia neuronal. Dentro de cada grupo de equivalencia, una única célula se desarrollará como progenitor neural, es decir, como neuroblasto (NB), mientras que el resto se diferenciarán en células epidérmicas o permanecerán indiferenciadas (Fig. 1).

Una vez diferenciado, el NB delamina, es decir, abandona la capa del neuroectodermo. El proceso sigue un patrón temporal reproducible en el que cada NB delamina en un momento determinado (Maurange y Gould, 2005). Ocurre entre los estadios embrionarios 8 y 11 y se produce en 5 oleadas (S1-S5). Cada NB ocupa posiciones subectodérmicas determinadas y expresa una combinación específica de genes debido a la información posicional, lo que determina su identidad individual. En cada hemineuromero se generan 30 NBs, cada uno de los cuales dará lugar a un único e invariable linaje de neuronas y/o células de la glía (Cabrera et al., 1987; Skeath et al., 1992).

Dado que estos mismos 30 NBs se repiten en cada uno de los hemineurómeros, se les considera “serialmente homólogos”, es decir, sus linajes son en general muy parecidos, pero no son idénticos. En este desarrollo diferencial a lo largo del eje A-P de los NBs

“segmentalmente homólogos” juegan un papel crucial los genes Homeóticos (Urbach et al., 2006).

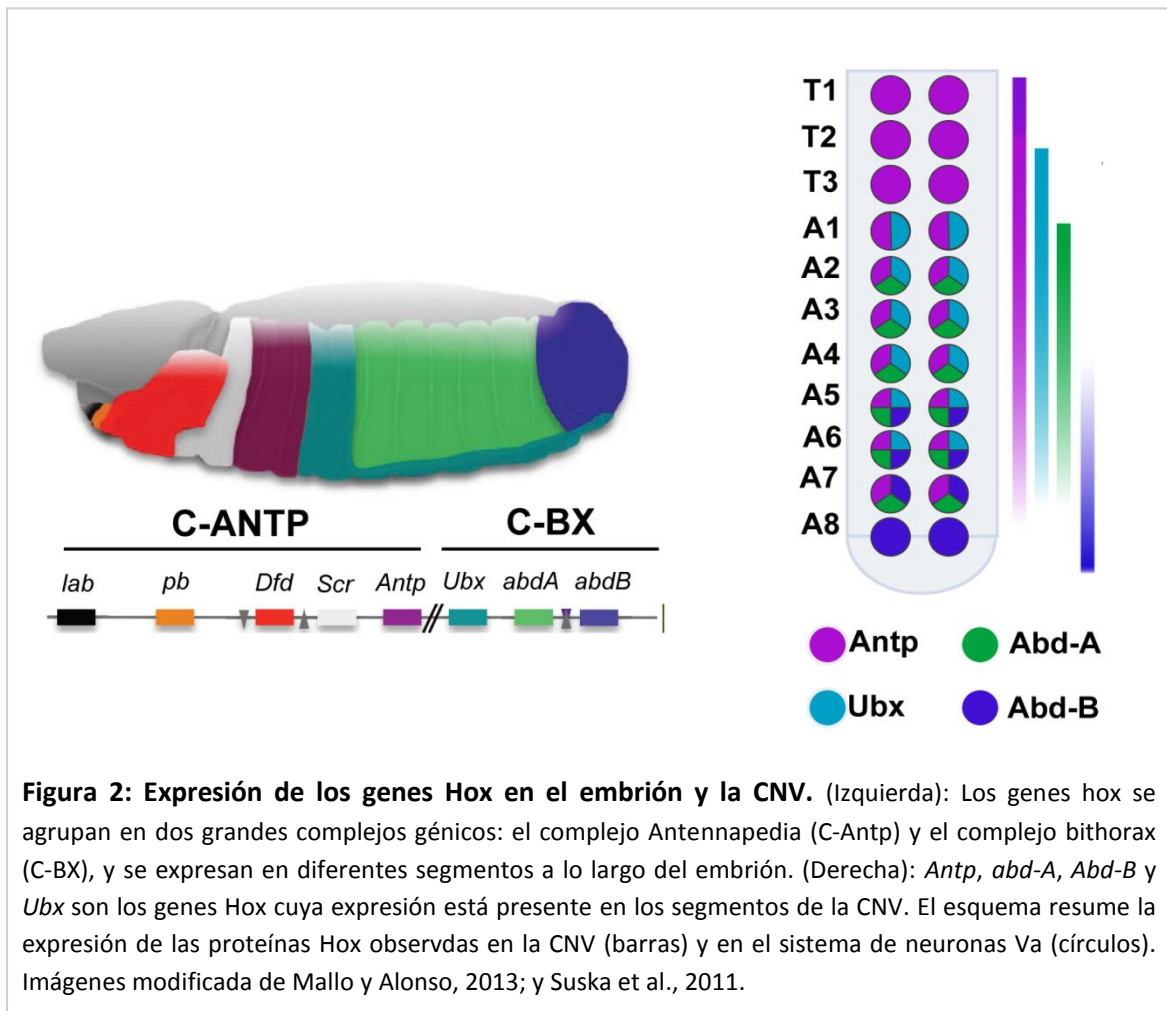


3.2 Los genes Hox y su implicación en la diferenciación a lo largo del eje A-P.

La familia de genes Homeóticos, o genes Hox (revisado por (Hirth et al., 1998) interviene de manera decisiva en el desarrollo de gran número de estructuras morfológicamente diferentes encontradas a lo largo del eje A-P, incluyendo la diferenciación de los linajes de NBs “segmentalmente homólogos”. Suelen actuar de manera conjunta con los cofactores de las familias Pbx y Meis codificadas por los genes *homothorax* (*hth*) y *extradenticle* (*exd*) (Casares y Mann, 1998; Merabet et al., 2005). Una de las características de los genes Hox es que todos ellos se encuentran situados en el tercer cromosoma, formando dos grandes complejos génicos: el complejo Antennapedia (C-Antp) y el complejo bithorax (C-BX). El C-Antp está compuesto por los genes *Antennapedia* (*Antp*), *labial* (*lab*), *sex combs reduced* (*scr*), *Deformed* (*Dfd*) y *proboscipedia* (*pb*), mientras que los genes *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) y *Abdominal-B* (*Abd-B*) forman el C-Bx (Fig. 2; Gehring et al., 2009).

El cerebro de *Drosophila* está compuesto por los segmentos B1-B3 y los tres segmentos subesofágicos (S1-S3), mientras que la CNV se compone de tres segmentos torácicos (T1-T3), y

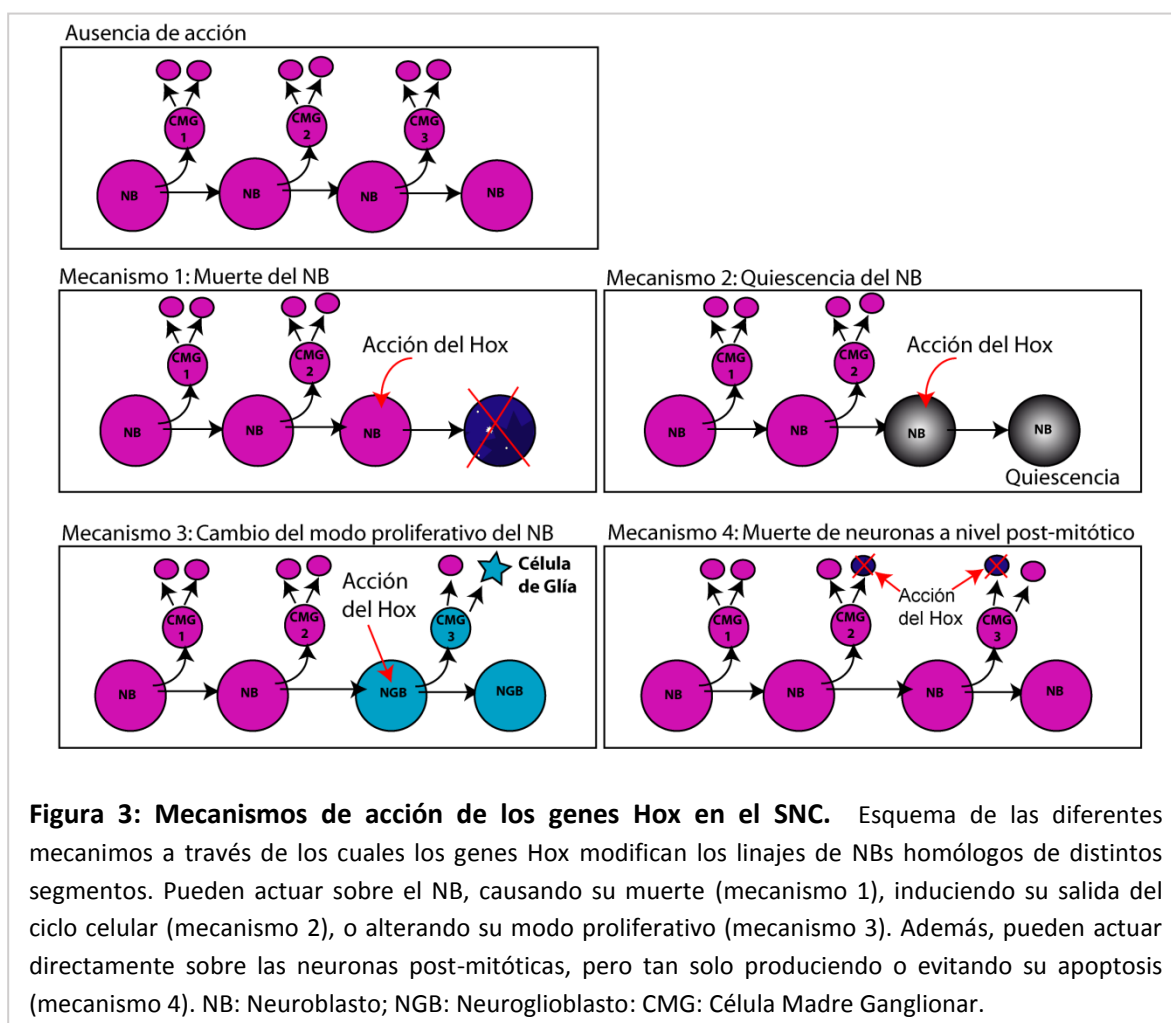
ocho abdominales (A1-A9) (Fig.3; Karlsson et al., 2010). El único de los genes perteneciente al C-Antp que se expresa en la CNV es *Antp*, presente en todos los segmentos desde T1 a A8, pero cuya expresión es mayor entre los segmentos T1-T3. (Fig. 4; revisado por Hirth et al., 1998; Miguel-Aliaga y Thor, 2004). El resto de genes de este complejo limitan su expresión a regiones cerebrales. En el caso del C-Bx, todos sus componentes son expresados en la CNV: *Ubx* es expresado desde la región posterior del T2 al A7 apareciendo su máxima expresión en A1-A2, *abd-A* se expresa en A2-A7 y *Abd-B* lo hace en A5-A9 (Fig. 2; revisado por Hirth et al., 1998). Resulta especialmente interesante el hecho de que en los dominios de predominancia de cada uno de los genes Hox, su expresión no es uniforme, sino que es altamente dinámica (revisado por (Hirth et al., 1998; Miguel-Aliaga y Thor, 2004), y los procesos por los cuales se produce este control selectivo a lo largo del eje AP no se conocen.



Además, poseen una importante característica por la cual la acción de los genes con una posición más posterior prevalecerá sobre la acción de los genes más anteriores. A este hecho se le conoce como “Regla de la Prevalencia Posterior” (Capovilla y Botas, 1998).

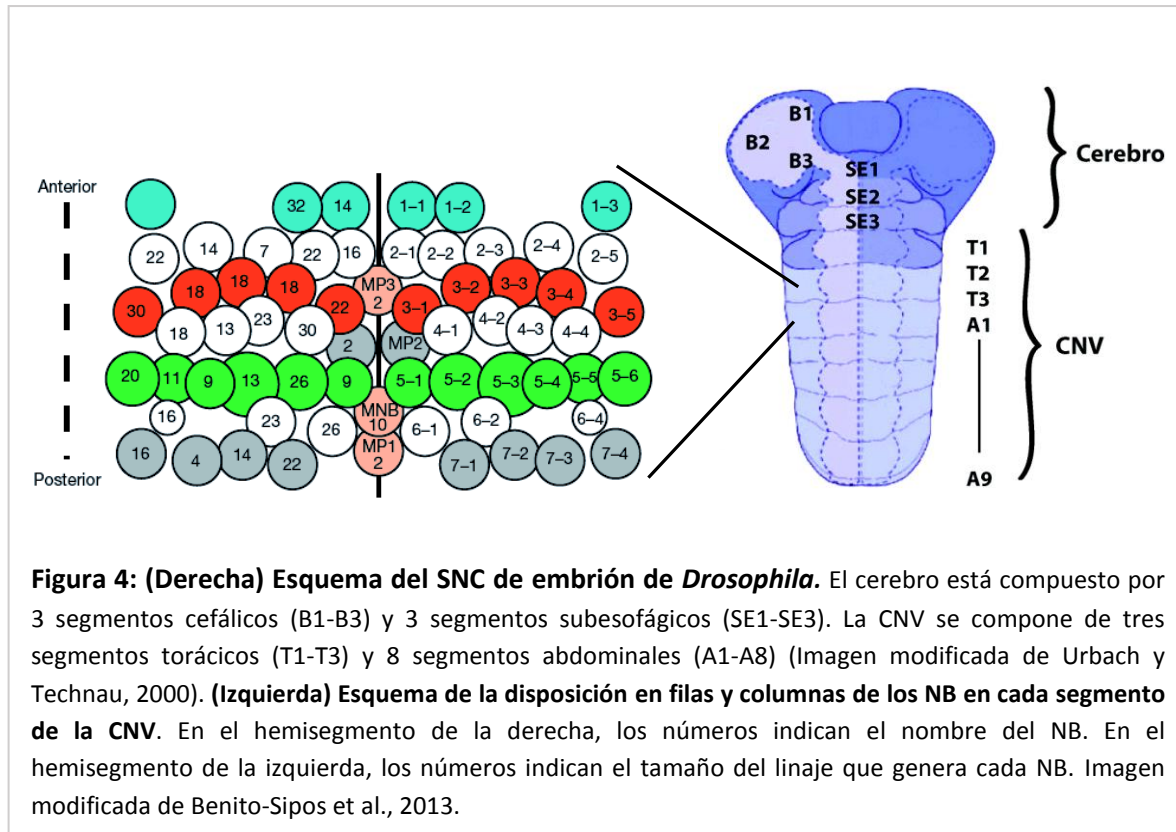
Hasta la fecha, se han descrito cuatro mecanismos de acción por los cuales los genes Hox crean linajes diferentes en NBs segmentalmente homólogos (Fig.3):

- 1- En determinados segmentos estos genes son capaces de producir procesos de muerte celular en el NB, impidiendo la creación de las células más tardías, y dando por tanto lugar a linajes compuestos por menor número de células que los formados por sus NBs homólogos (Bello et al., 2003).
- 2- Existen casos en los que la acción de los Hox fuerza al NB a salir del ciclo celular, impidiendo de esta manera continuar generando la progenie más tardía. En este caso, igual que en el anteriormente citado, el linaje creado por el NB será también menor que el del sus homólogos segmentales (Karlsson et al., 2010).
- 3- En ciertos NBs, como ocurre con el NB 6-4 los genes Hox controlan el modo de proliferación, determinando el tipo de progenie que crean. Por ejemplo, en segmentos torácicos la acción de los genes Hox son responsables de que el NB 6-4 actúe como Neuroglioblasto, creando tanto células gliales como neuronas, mientras que sus homólogos segmentales de los segmentos abdominales se comportan como Glioblastos, es decir, su linajes se componen exclusivamente de células de la glía (Berger et al., 2005, 2010).
- 4- Los genes Hox pueden también actuar a nivel post-mitótico. Pueden, de manera específica de segmento, actuar directamente sobre las neuronas, o bien forzándolas a sufrir procesos apoptóticos, o por el contrario evitando que los sufran. (Miguel-Aliaga y Thor, 2004; Miguel-Aliaga et al., 2008; Rogulja-Ortmann et al., 2007; Suska et al., 2011).



3.3 Del NB a la célula post-mitótica.

Los NBs creados en cada hemineurómero son células multipotenciales a partir de las cuales se genera la gran mayoría de las células presentes en el SNC del embrión. De acuerdo a la posición y a la expresión de algunos marcadores moleculares, los 30 NBs se subdividen en 7 filas y 6 columnas hecho que proporciona una nomenclatura lógica para nombrar a cada NB de *Drosophila*: el NB situado en la fila 1 y en la columna 2 se le nombra como NB 1-2. (Doe, 1992). En conjunto, estos 30 NBs crean de media durante el desarrollo 350 células en cada hemineurómero: 290 interneuronas, 30 motoneuronas y 30 células de la glía. (Landgraf et al., 1997; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). En este proceso, cada NB va sufrir diferente número de divisiones en función de su posición relativa.

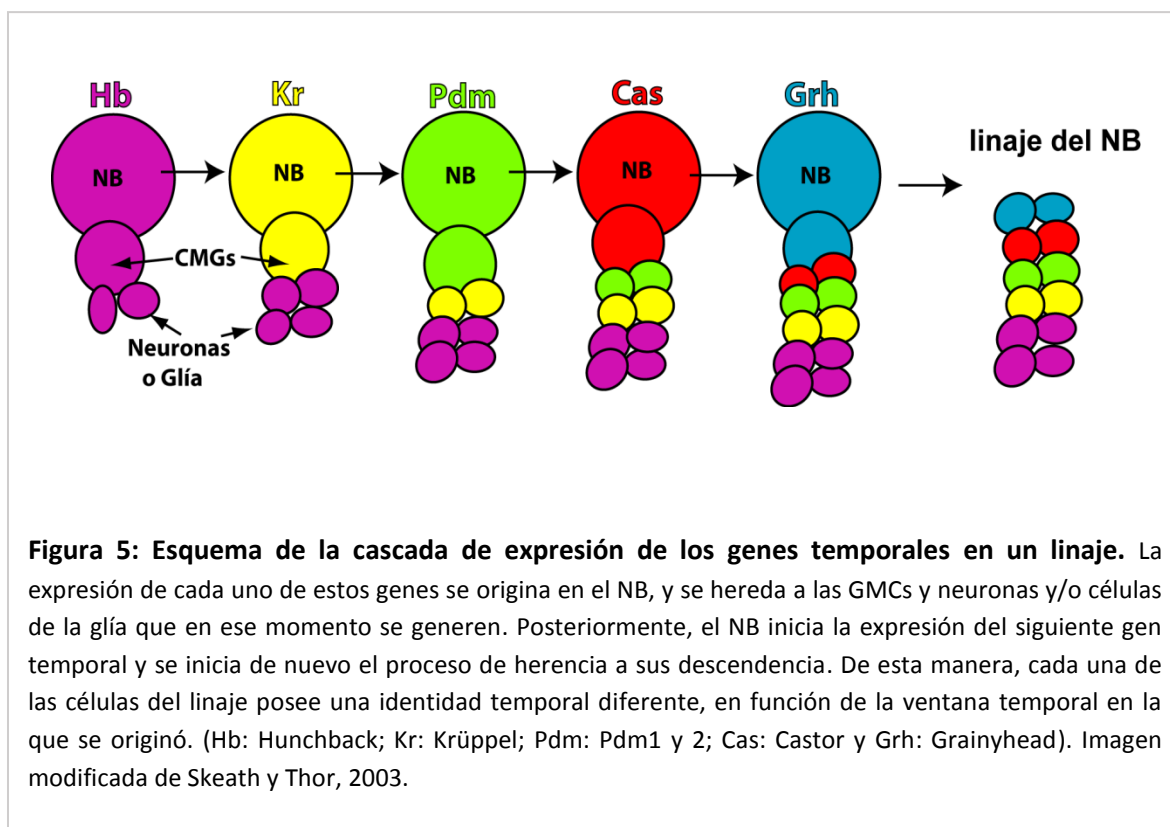


Los NBs se caracterizan por sufrir divisiones de tipo asimétrico, lo que indica que las células resultantes son diferentes una respecto a la otra. En cada una de estas divisiones se genera un nuevo NB idéntico al anteriormente existente, y además, otro tipo celular también con limitada capacidad proliferativa, llamado Célula Madre Ganglionar (CMG) (Chia y Yang, 2002). De este modo, cada NB se regenera a si mismo mientras que va generando nuevas CMGs en cada una de las divisiones.

En el proceso de división asimétrica del NB tienen un papel fundamental el factor de transcripción Prospero (Pros) y su adaptador Miranda. En el momento de la división, estas proteínas se distribuyen de manera asimétrica, adquiriendo posiciones basales, de tal manera que se heredarán exclusivamente a la CMG (Skeath y Thor, 2003). En esta célula, Pros se transloca al núcleo obligando a CMG a salir del ciclo celular y de esta manera sufrir posteriormente una única división que celular (Wang y Chia, 2005).

3.3.1 Generación de CMG diferentes a partir de un mismo NB: Los genes temporales.

La característica que dota de una identidad diferencial a cada una de las CMGs originadas a partir del mismo NB, y por tanto a su descendencia, es la expresión de diferentes genes perteneciente a la conocida como ‘cascada de genes temporales’. Cada NB expresa una serie de factores de transcripción de manera secuencial y en un orden concreto, que fue definido por el grupo de Cris Doe (Isshiki et al., 2001). El primero de los conocidos como genes temporales en expresarse en el NB es *hunchback* (*hb*). Posteriormente el NB expresa *Krüppel* (*kr*), después *pdm1* y *2* (nombrados a partir de ahora *pdm*), más tarde *castor* (*cas*), y por último *grainyhead* (*grh*) (Fig. 5; Grosskortenhaus et al., 2005; Isshiki et al., 2001; Maurange et al., 2008; Novotny et al., 2002; Pearson y Doe, 2003; Tran y Doe, 2008). Algunos NB expresan de manera transitoria más de uno de estos genes a la vez, existiendo por tanto ventana temporales mixtas (Baumgardt et al., 2009; Cleary y Doe, 2006; Karlsson et al., 2010).



Otra característica de la cascada de genes temporales es que, aunque en general todos los NBs presentan cascadas temporales muy parecidas, no todos los NBs expresan todos los genes temporales. Existen casos en los que la cascada empieza a partir del segundo, del tercer, del cuarto o incluso del último gen (Baumgardt et al., 2009). También, a su vez, existen NBs en los que la cascada de genes temporales que les caracteriza no incluye alguno de los últimos genes de la secuencia. En cualquier caso, todos los NBs expresan al menos uno, pero generalmente más, de los conocidos como genes temporales (Baumgardt et al., 2009; Maurange et al., 2008; Tran y Doe, 2008). Cuando un NB se divide, una de las dos células creadas seguirá comportándose como NB, y la otra célula resultante será una CMG. Esta última, heredará la expresión del gen temporal que en ese momento se está expresando el NB (Technau et al., 2006). Es decir, cada una de las CMGs resultantes de un mismo NB, se distinguirán entre sí por su diferente identidad temporal, lo que se traduce en una expresión de diferente gen temporal. Además, la expresión de este gen o genes temporales se heredará por las células post-mitóticas creadas por cada CMG. Por tanto, las características del linaje creado a partir de un NB dependerán tanto de la información proveniente de la identidad espacial del NB, como de la información temporal del NB y la CMG, o lo que es lo mismo, qué gen o genes temporales expresan.

3.3.2 La división asimétrica de la CMG y la ruta de señalización de Notch.

Las diferentes CMGs formadas por cada NB van a sufrir una única división, en la que se forman dos células post-mitóticas que pueden ser neuronas y/o células de la glía, o pueden sufrir procesos de muerte celular (Doe y Bowerman, 2001). Se trata de una división de tipo asimétrico en la que resulta crucial la ruta de señalización de Notch, que determina las distintas identidades de las neuronas hijas. Al dividirse, se produce en la CMG un reparto diferencial de la proteína Numb, que se heredará de manera desigual a cada célula, es decir, tan solo una de ellas retendrá la proteína (Doe, 1996). En esta neurona, Numb inhibe la ruta de señalización activada por Notch, forzándola a que adquiera la identidad conocida como “B” o “Notch OFF” (Cau y Blader, 2009; Spana et al., 1995). Numb actúa impidiendo que la proteína transmembrana Sanpodo (spdo) adquiera su localización en la membrana de la celular, hecho indispensable para que el receptor Notch (NotchR) puede ser activado a su forma Notch intra (Notch i) por su ligando Delta (Babaoglan et al., 2009; Hutterer y Knoblich, 2005). Por el contrario, la célula en la que no se encuentra presente Numb sufre una activación de la ruta, adquiriendo el destino conocido como “A” o “Notch ON”. La activación de la ruta en solo una

de las neuronas hermanas es la responsable de que adquieran destinos celulares diferentes. Tanto la identidad “Notch ON” como la “Notch OFF”, pueden especificar destino de neurona, glía o muerte celular programada dependiendo del linaje concreto del que se trate.

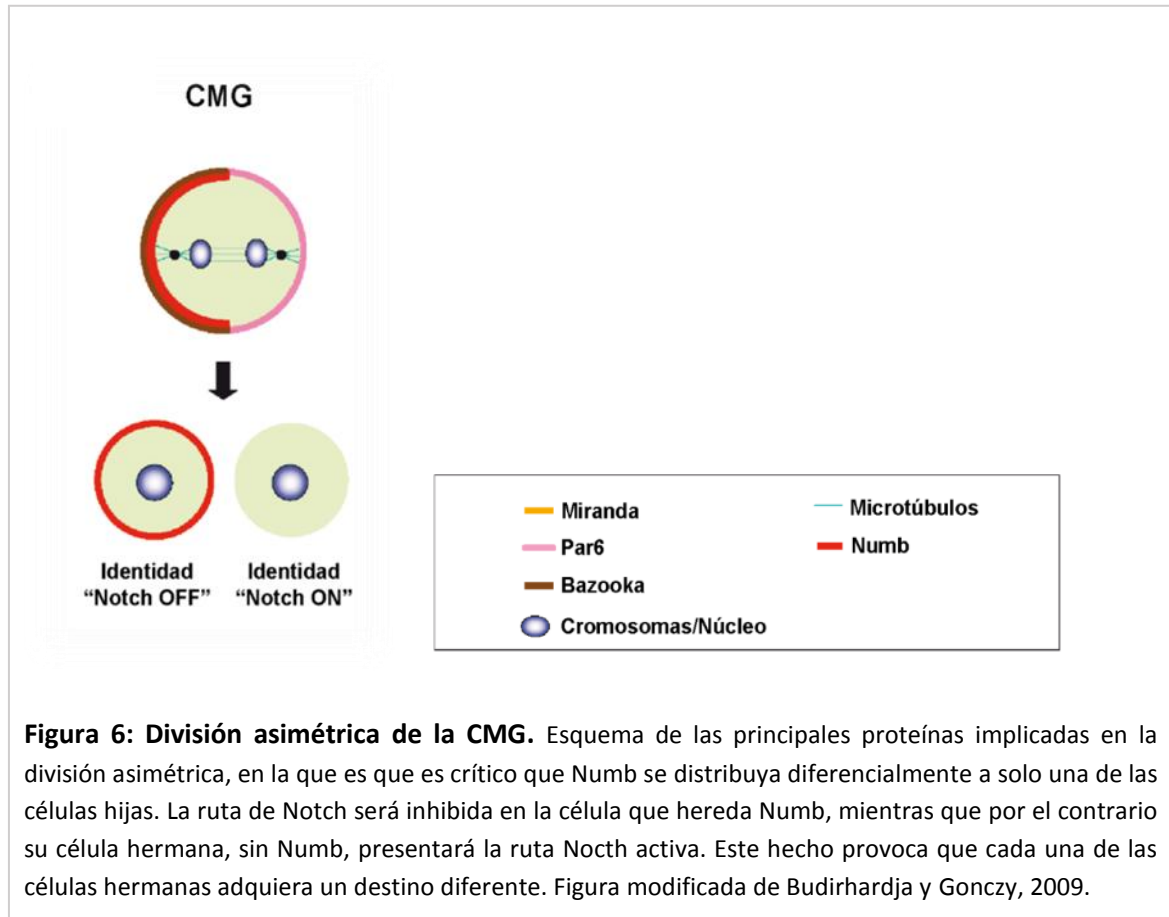


Figura 6: División asimétrica de la CMG. Esquema de las principales proteínas implicadas en la división asimétrica, en la que es crítico que Numb se distribuya diferencialmente a solo una de las células hijas. La ruta de Notch será inhibida en la célula que hereda Numb, mientras que por el contrario su célula hermana, sin Numb, presentará la ruta Nocth activa. Este hecho provoca que cada una de las células hermanas adquiera un destino diferente. Figura modificada de Budirhardja y Gonczy, 2009.

Existen múltiples posibilidades para estudiar escenarios en los que la ruta de Notch se ve bloqueada, pero posiblemente los más estudiados son mutantes carentes de los genes *spdo*, *notch*, o la sobre-expresión de la *numb* producen. Por el contrario, en los mutantes *numb* o en la sobre-expresión de Notchi, ambas células adquieren el destino “Notch ON” (Doe y Bowerman, 2001; Fuerstenberg et al., 1998; Hutterer y Knoblich, 2005).

3.4 Especificación de identidades únicas.

A pesar de los complejos mecanismos que controlan la información posicional y temporal, la concreción de los fenotipos de las neuronas terminales resulta incluso más compleja. En las neuronas post-mitóticas se genera un contexto celular único, creado por la expresión de una batería de genes diferente en cada una de ellas, en función de la información posicional y temporal heredada desde sus progenitores. Estos genes promueven posteriormente la expresión de una combinación de factores específica en cada tipo celular, que regula la diferenciación temprana de estas células, determinando por ejemplo, qué neurotransmisor expresará, o el recorrido que seguirá su axón hasta sinaptar (Karcavich y Doe, 2005; Pearson y Doe, 2004). A este conjunto de genes post-mitóticos que determinan las características terminales de la célula se les conoce con el nombre de “genes de diferenciación terminal” (Baumgardt et al., 2007, 2009). Esta información debe integrarse de manera conjunta en cada una de las células post-mitóticas.

Resulta especialmente interesante el hecho de que neuronas localizadas en posiciones diferentes, producidas por NBs diferentes en ventanas temporales diferentes, e incluso con distintas proyecciones axonales, pueden compartir características comunes como puede ser la expresión del mismo neuropéptido y/o neurotransmisor (Losada-Pérez et al., 2010). Por el contrario, neuronas que presentan una información posicional y temporal muy parecida, como por ejemplo células del mismo linaje o neuronas “homólogas segmentales”, pueden sufrir procesos de diferenciación diferentes, produciendo células de la glía, neuronas peptidérgicas o sufriendo procesos apoptóticos (Miguel-Aliaga et al., 2008).

Además de los determinantes intrínsecos presentes en cada célula, en los procesos de diferenciación terminal juegan un papel importante ciertos factores extrínsecos que actúan a través de señales retrógradas provenientes de los tejidos diana, y que pueden alterar la expresión de algunos genes de diferenciación terminal (Coulombe y Kos, 1997; Coulombe y Nishi, 1991; Koo y Pfaff, 2002; Landis, 1996). Entre estos factores, cabe destacar las rutas de señalización, como BMP (“Bone Morphogenetic Proteins”), que son activadas por moléculas secretadas en el órgano o célula diana, estableciendo por tanto un diálogo entre el tejido diana y el código combinatorio específico de cada neurona (Allan et al., 2003; Ernsberger y Rohrer, 1999; Pavelock et al., 2007).

Este hecho pone de manifiesto, una vez más, el elevado número de mecanismos genéticos diferentes e independientes existentes en el desarrollo de la CNV de *Drosophila*, muchos de

los cuales, además, están conservados en organismos superiores como mamíferos (Okano, 2009).

4. El neuropéptido Capability como marcador para el estudio de la especificación neuronal.

El estudio de cómo se especifican los destinos neuronales y cómo se crea la amplia diversidad de tipos neurales presentes en la CNV, requiere el uso de un sistema sencillo, en el que se puedan conocer detalles del linaje de la célula o células a estudiar. Durante los últimos años, en *Drosophila*, los neuropéptidos (Np) se han mostrado como una de las mejores herramientas a la hora de abordar este problema, debido, entre otros motivos, a que la expresión de cada Np se restringe a un número muy reducido de células. Algunos de los neuropéptidos más estudiados son FMRFamida (FMRFa), Neuropeptide-like precursor 1 (Nplp1) o Leucoquinina (Lk) (Allan et al., 2003, 2005; Baumgardt et al., 2007, 2009; Benito-Sipos et al., 2011; Gabilondo et al., 2011; Keshishian y Kim, 2004; Losada-Pérez et al., 2010; Miguel-Aliaga et al., 2004). Mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas se pueden reconocer y marcar de manera inequívoca las neuronas que expresan cada uno de estos Nps, y por tanto estudiar el desarrollo de estas neuronas en contextos genéticos diferentes.

Para poder resolver algunas cuestiones relacionadas con el desarrollo de la CNV y la especificación neuronal, en la presente tesis doctoral hemos hecho uso del Np Capability (Capa) como marcador de diferenciación terminal. Este Np fue primeramente descrito en *Manduca sexta* (Tublitz y Truman, 1985) y actualmente se conoce su presencia en muchas familias de insectos (Koehler y Predel, 2010; Nachman y Coast, 2007; Neupert et al., 2010; Predel y Wegener, 2006; Predel et al., 2003; Roth et al., 2009). Su función fisiológica varía dependiendo de la especie, pero desarrolla, en general, un papel clave en procesos osmorregulatorios. En las especies de dípteros, incluyendo *Drosophila melanogaster*, el péptido de Capa cumple una función diurética, elevando los niveles de óxido nítrico, cGMP y calcio en las principales células de los túbulos de Malpigio (Davies et al., 2013).

Más allá de su función, para el estudio llevado a cabo en esta tesis doctoral, resulta especialmente interesante su patrón de expresión altamente restringido en la CNV. Este hecho propicia que las neuronas neuropeptidérgicas de Capa sean un escenario ideal para profundizar en los procesos y mecanismos responsables de producir, a partir de un único tipo

Introducción

celular como es el NB, la amplia diversidad de tipos neurales presentes en el SNC. Además, resulta especialmente interesante para tratar de conocer los mecanismos de acción de los genes Hox por los que se restringe la aparición de las células que expresan Capa a tan solo 3 de los segmentos abdominales de la CNV.

OBJETIVOS

Objetivos:

El objetivo principal de esta tesis doctoral es ahondar en el conocimiento acerca de los mecanismos involucrados en la especificación celular y en el proceso a partir del cual un único tipo celular como es el NB, genera la amplia diversidad de tipos neuronales presentes en el Sistema Nervioso Central. Este conocimiento resulta esencial para explotar el potencial terapéutico de las células madre, especialmente en el ámbito de la reparación y regeneración de tejidos. A través de este estudio, se pretende profundizar en la acción de los genes Hox, tratando de describir los mecanismos por los cuales modifican tanto el tamaño como la identidad de los linajes neurales homólogos, es decir, linajes generados por el mismo NB nacido en distintos segmentos. Los linajes homólogos pueden variar entre sí tanto en el tamaño del linaje como en la identidad de las células que lo conforman. Para poder responder a estas complejas preguntas biológicas se ha utilizado como modelo el grupo de neuronas peptidérgicas que expresan el neuropéptido Capability (Capa) en la Cuerda Nerviosa Central de *Drosophila melanogaster*, y se han fijado los siguientes objetivos concretos:

- 1- Describir la expresión de Capa en la CNV, y caracterizar tanto el NB progenitor como la ventana temporal de las neuronas que expresan este neuropéptido.
- 2- Estudiar cómo se acota el patrón de expresión de Capa a lo largo del eje antero-posterior, y la relación que los genes Hox tienen en este proceso.
- 3- Profundizar en el conocimiento sobre qué genes Hox, y a través de qué mecanismos, generan linajes homólogos en cada segmento. Para ello, se analizará la expresión de Capa en escenarios de falta y ganancia de función de los genes Hox.
- 4- Conocer nuevos genes implicados en el proceso de especificación de las neuronas que expresan Capa, a través de la realización de un *screening* dirigido exclusivamente a genes cuya expresión se produce en la CNV.
- 5- Estudiar en profundidad los fenotipos de los nuevos genes implicados en el proceso de especificación de las neuronas que expresan Capa para poder descubrir nuevos mecanismos de especificación neuronal.
- 5- Estudiar en profundidad los fenotipos de los nuevos genes implicados en el proceso de especificación de las neuronas que expresan Capa para poder descubrir nuevos mecanismos de especificación neuronal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y Métodos

1. Líneas de *Drosophila melanogaster*.

Todas las líneas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en esta tesis doctoral, han sido conservadas y cuidadas de acuerdo a las técnicas clásicas descritas por Ashburner (Ashburner, 1989). El medio estándar utilizado para su crecimiento estaba compuesto por agar (1,15 %), azúcar (7 %), levadura (10 %) y harina de trigo (5 %), y ácido propiónico como antimicótico (0,5 %).

Los experimentos se han llevado a cabo a una temperatura de 25 °C, con una humedad relativa del 60 %, y con un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad. En el caso de los experimentos en los que se hace uso del sistema Gal4-UAS, la temperatura empleada fue de 26 °C tanto para las líneas transgénicas como para los controles.

Se han utilizado las siguientes líneas de moscas transgénicas:

a) Líneas Gal4

- ***cas-Gal4*** (cedido por S. Thor).
- ***dimm-Gal4*** (cedido por S. Thor).
- ***elav-Gal4*** (cedido por S. Thor).
- ***en-Gal4*** (cedido por F.J. Díaz-Benjumea).
- ***laidybird early(k)-Gal4*** (referido en el texto como ***lbe(k)-Gal4***; cedido por S. Thor).
- ***pros-Gal4*** (cedido por S. Thor).
- ***va-Gal4*** (cedido por S.Thor)
- ***wor-Gal4*** (cedido por F.J. Díaz-Benjumea).

b) Líneas mutantes

- ***mwh jr st red Shd abdA^{M1}e^{ro}*** (referido en el texto como ***abdA***) y ***abdA^{p10}*** (cedidos por E. Sánchez-Herrero).
- ***Antp^{12(NS-rvc12)}*** y ***Antp¹⁴*** (cedido por E.Sánchez-Herrero).
- ***atona¹*** (Bloomington Stock Center).
- ***ap^{P44}*** (cedido por S. Thor).
- ***bx¹*** (Bloomington Stock Center).
- ***chip^{e5.5}*** (Bloomington Stock Center).

- *cas*^{Δ1}, *cas*^{Δ3} y *cas*^{Δ4} (cedidos por S. Thor).
- *col*¹ y *col*³ (cedidos por S. Thor).
- *croI*⁰⁴⁴¹⁸ (Bloomington Stock Center).
- *da*¹ (Bloomington Stock Center).
- *dac*³ y *dac*⁴ (cedido por S. Thor).
- *Df(2L)ED773* (referido en el texto como *pdm1/2* ; cedido por S Thor).
- *Df(3L)H99* (referido en el texto como *H99* ; cedido por M. Calleja).
- *dimM*^{P1} (cedido por S. Thor).
- *dve*^{01D01W-L186} (cedido por F.J. Díaz-Benjumea).
- *eg*² (Bloomington Stock Center).
- *ems*¹ (Bloomington Stock Center).
- *Eyg*² (Bloomington Stock Center).
- *el*³³¹ *noc*^{Δ64} (cedidos por F.J. Díaz-Benjumea).
- *fkH*⁶ (cedidos por F.J. Díaz-Benjumea).
- *ftz*¹⁰ (Bloomington Stock Center).
- *grn*^{h10} (cedido por Stefan Thor).
- *grh*^{IM} y *grh*^{Df3064} (cedidos por S. Thor).
- *gg*⁰³⁹²⁸ (Bloomington Stock Center).
- *hb*^{P1} *hb*^{FB} (cedido por C. Doe).
- *hh*^{Ts2} (Bloomington Stock Center).
- *htl*^{AB42} (cedido por F.J. Díaz-Benjumea).
- *jumu*¹¹⁶⁸³ (cedido por W. Chia).
- *ken*⁰²⁹⁷⁰ (Bloomington Stock Center).
- *knirps*^{RI-1} (Bloomington Stock Center).
- *klu*^{212IR51C} (cedido por W. Chia).
- *kr*¹ *kr*^{CD} (cedido por C. Doe).
- *lim3*² (Bloomington Stock Center).
- *nab*^{R52} (cedido por F.J. Díaz-Benjumea).
- *numb*¹ (Bloomington Stock Center).
- *osa*² (Bloomington Stock Center).
- *pnr*¹ (Bloomington Stock Center).
- *rn*²⁰ (Bloomington Stock Center).
- *shn*¹ (Bloomington Stock Center).
- *sbb*^{BG01610} (Bloomington Stock Center).
- *sbb*⁶ (Bloomington Stock Center).

- ***spdo*^{G104}** (cedido por S. Thor).
- ***stc*⁰⁵⁴⁴¹** (cedido por F:J: Díaz-Benjumea).
- ***sqz*^{ie}** (cedidos por S. Thor).
- ***svp*¹** (cedidos por S. Thor).
- ***tap*⁰¹⁶⁵⁸** (Bloomington Stock Center).
- ***tll*^{l⁴⁹}** (Bloomington Stock Center).
- ***ton*^{hdl}** (Bloomington Stock Center).
- ***tup*¹** (Bloomington Stock Center).
- ***mwh jr³ Ubx' e'*** (referido en el texto como ***Ubx*** ; 1981; cedido por E. Sánchez-Herrero).
- ***vg*^{nw}** (Bloomington Stock Center).
- ***vn*^{C221}** (cedido por F:J: Díaz-Benjumea).
- ***zfh2*^{MS209}** (cedidos por S. Thor).

c) **Líneas UAS**

- ***UAS-abdA*** (cedido por D. del Saz).
- ***UAS-AbdB^m*** (cedido por M. Akam).
- ***UAS-Antp*** cedido por E. Sánchez-Herrero).
- ***UAS-cas*** (cedido por S. Thor).
- ***UAS-dicerII*** (cedido por M. Calleja).
- ***UAS-cas*** (cedido por S. Thor).
- ***UAS-dac*** (Allan y col., 2003; cedido por S. Thor).
- ***UAS-hbRNAi*** (cedido por S. Thor)
- ***UAS-p35*** (cedido por M. Calleja).
- ***UAS-GluedDN*** (cedido por S. Thor)
- ***UAS-Nintra*** (cedido por A. Baonza).
- ***UAS-nmEGFP*** (cedido por S. Thor).
- ***UAS-numb*** (cedido por A. Hidalgo).
- ***UAS-klu*** (cedido por W. Chia).
- ***UAS-GFP*^{superbrighth S65T}** (cedido por S. Thor).
- ***UAS-rpr*** (cedido por Bloomington Stock Center).
- ***U-sbb*^{ey12945}** (Bloomington Stock Center).
- ***UAS-Ubx²¹*** (cedido por E. Sánchez-Herrero).

d) Líneas lacZ

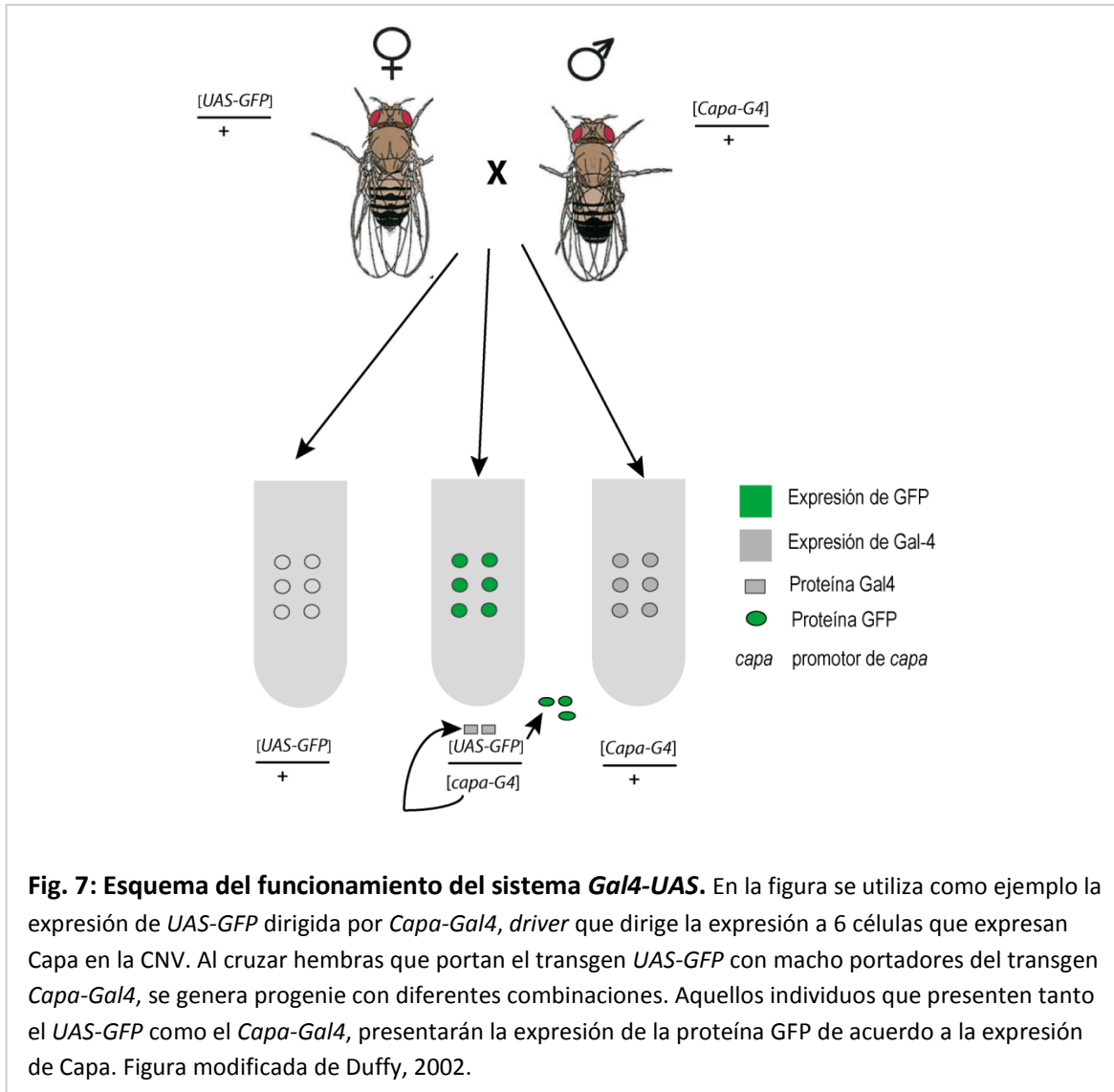
- ***en-lacZ*** (cedido por C. Doe).
- ***gsb*⁰¹¹⁵⁵** (referido en el texto como ***gsb-lacZ***; cedido por S. Thor).
- ***hkb*⁵⁹⁵³-lacZ** (cedido por S. Thor).
- ***klu-lacZ*** (cedido por W. Chia).
- ***laidybird early(k)-lacZ*** (referido en el texto como ***lbe(k)-lacZ***; cedido por S. Thor).
- ***mirror-lacZ*** (cedido por S. Campuzano).
- ***sbb-lacZ*** (Bloomington Stock Center).
- ***unpg*^{r37}-lacZ** (cedido por C. Doe).
- ***wg-lacZ*** (cedido por F.J.Díaz-Benjumea).

Como control para los experimentos se utilizaron frecuentemente individuos de la línea *orizo 2*

2. Sistema UAS-GAL4.

El sistema de levaduras Gal4>UAS, descrito por Brand y Perrimon (Brand y Perrimon, 1993), permite la expresión *in vivo* de cualquier proteína o secuencia génica de interés en una célula o grupo de células, en un momento concreto. Se basa en un factor de transcripción llamado *Gal4* y unas secuencias de ADN específicas a las que se une, conocidas como *UAS* (*Upstream Activating Sequences*).

El grupo de células donde se quiere expresar la proteína debe expresar el *Gal4*, que se unirá a las secuencias *UAS* y promoverá la transcripción del *gen X* que se haya situado en 3'. De esta manera se consigue la expresión de un *gen X* deseado, en la célula o grupo de células que expresen el *Gal4*.



3. Cromosomas balanceadores.

Las líneas de moscas han sido mantenidas sobre cromosomas balanceadores. Los cromosomas balanceadores presentan distintas reordenaciones cromosómicas que impiden el apareamiento con su homólogo durante la meiosis, y por tanto, imposibilitan el proceso de recombinación. Son especialmente útiles a la hora de mantener las líneas de moscas mutantes, muchas de las cuales deben vivir en heterocigosis, puesto que resultan letales en homocigosis. En estos casos, la ausencia de recombinación evita la pérdida de la mutación. Además, debido a que incluyen en su secuencia marcadores dominantes y/o genes reporteros (marcadores de expresión como GFP o β -galactosidasa), permiten la identificación por descarte de los individuos homocigóticos.

Para el mantenimiento de las líneas transgénicas y la realización de los experimentos de esta tesis doctoral, se han utilizado los siguientes cromosomas balanceadores:

- **Cyo** (*Curly of Oster*), **CAG** (al tradicional *Cyo* se le añade la expresión de *actina-Gal4>UAS-GFP*), **CTG** (al tradicional *Cyo* se le añade la expresión de *twisted-Gal4:UAS-GFP*) y **CD** (al tradicional *Cyo* se le añade la expresión de *Deformed:UAS-GFP*) para las líneas transgénicas del cromosoma 2.

- **TM6B** ("Third Multiple 6B"), **TAG** (al tradicional *TM6B* se le añade la expresión de *Actina-Gal4>UAS-GFP*), **TTG** (al tradicional *TM6B* se le añade la expresión de *twi-Gal4>UAS-GFP*) y **TD** (al tradicional *TM6B* se le añade la expresión de *Deformed:UAS-GFP*) para las líneas transgénicas del cromosoma 2.

4. Técnicas de Inmunohistoquímica.

Para la recolección de embriones se usaba un medio compuesto por agar (3 %), azúcar (5,4 %), ácido acético (0,1 %) y zumo de fruta. Dependiendo del estadio de interés en cada caso, se recogían embriones de entre 15 y 24 horas a 25 °C ó 26 °C en función del experimento (ver apartado 1 de "Material y Métodos": "Líneas de *Drosophila melanogaster*"). Tras su recolección en un tamiz con ayuda de un pincel, los embriones se sumergían en lejía (Lejía Conejo®) durante 3 minutos para eliminar el corion. De esta manera se posibilitaba la selección, bajo la lupa de fluorescencia y en PBT (PBS, 0,3%Tritón), de los genotipos de interés del estadio deseado, de acuerdo a los criterios establecidos por Campos Ortega y Hartenstein.(Campos-Ortega, 1997; Hartenstein, 1993)

Se realizaron la disecciones de la CNVs de los individuos seleccionados en PBS (Tampón fosfato salino), con ayuda de una lupa de disección, y se colocaron en porta-objetos previamente tratados con una solución de poli-lisina (poly-l-lysine hydrobromide, ref: P1524, *Sigma-Aldrich* y Photo-Flo, ref: 1464502, *Kodak*). Posteriormente, se realizó el fijado de los tejidos mediante para-formaldehído (PP) al 4 %, durante 20 minutos y se bloqueó con BBT (PBS, 0,3 %Triton, 2%BSA). Se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios (ver apartado "Resultados") durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavaron con PBT y se incubaron los anticuerpos secundarios pertinentes (ver apartado "Resultados") durante una hora en oscuridad. Tras lavarlo en PBT, se montaron las preparaciones con VectaShield (ref: H-1000,

Vector Laboratories) antes de su observación y análisis con ayuda de un microscopio de fluorescencia.

Los siguientes anticuerpos primarios han sido utilizados en la realización de esta tesis doctoral:

- **Anti-abd A**; cedido por E.Sánchez-Herrero, policlonal de conejo. Dilución de uso 1:100.
- **Anti-Abd B**; Developmental Studies Hybridoma Bank, monoclonal de ratón. Dilución de uso 1:100.
- **Anti-Allatostatina A**; Developmental Studies Hybridoma Bank, monoclonal de ratón. Dilución de uso 1:10.
- **Anti- β -galactosidasa**; PROMEGA, monoclonal de ratón. Dilución de uso 1:200.
- **Anti-Klumpfuss**; cedido por W. Chia, policlonal de conejo. Dilución de uso 1:1000.
- **Anti-Grainyhead**; cedido por S. Thor, policlonal de rata. Dilución de uso 1:1000.
- **Anti-Castor**; cedido por W. Odenwald, policlonal de conejo. Dilución de uso 1:200.
- **Anti-Dachshund**; Developmental Studies Hybridoma Bank; monoclonal de ratón. Dilución de uso 1:25.
- **Anti-DH31**; cedido por J. Veenstra, policlonal de conejo. Dilución de uso 1:100.
- **Anti-Dimmed**; cedido por S. Thor, policlonal de cobaya. Dilución de uso 1:1000.
- **Anti-Dimmed**; cedido por S. Thor, policlonal material y métodos de conejo. Dilución de uso 1:1000.
- **Anti-Ladybird early**; cedido por K. Jagla), policlonal de conejo. Dilución de uso 1:100.
- **Anti-pro-Capa**; cedido por J. Veenstra, policlonal de conejo. Dilución de uso 1:100.
- **Anti-proFMRFamida**; cedido por S. Thor, policlonal de conejo. Dilución de uso 1:1000.
- **Anti-Ubx**; cedido por E. Sánchez-Herrero, monoclonal de ratón. Dilución de uso 1:100.

Los siguientes anticuerpos primarios han sido utilizados en la realización de esta tesis doctoral:

- Anti-IgG de **ratón-Alexa Fluor 488**; Jackson ImmunoResearch, policlonal de cabra.
- Anti-IgG de **ratón-Alexa Fluor 555**; Jackson ImmunoResearch, policlonal de cabra.
- Anti-IgG de **ratón-Alexa Fluor 647**; Jackson ImmunoResearch, policlonal de cabra.
- Anti-IgG de **conejo-Alexa Fluor 488**; Jackson ImmunoResearch, policlonal de cabra.
- Anti-IgG de **conejo-Alexa Fluor 555**; Jackson ImmunoResearch, policlonal de cabra.
- Anti-IgG de **conejo-Alexa Fluor 647**; Jackson ImmunoResearch, policlonal de cabra.
- Anti-IgG de **cobaya-Alexa Fluor 488**; Jackson ImmunoResearch, policlonal de cabra.
- Anti-IgG de **cobaya-Alexa Fluor 555**; Jackson ImmunoResearch, policlonal de cabra.
- Anti-IgG de **cobaya-Alexa Fluor 649**; Jackson ImmunoResearch, policlonal de cabra.

*La dilución de uso de todos los anticuerpos secundarios fue 1:500.

5. Obtención y análisis de imágenes de microscopia óptica.

Para la observación y obtención de imágenes digitales se usó microscopía de fluorescencia, utilizando los equipos LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 M (Zeiss), LSM510 acoplado a un microscopio vertical Axio Imager.Z1 M (Zeiss) y LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss).

Para la obtención y tratado de las imágenes, se utilizó el software LSM 5 Image Browser. Para su posterior edición y montado de figuras se utilizaron los programas Adobe Photoshop® CS4 y Adobe Illustrator® CS4.

El análisis de la intensidad de señal observada en diferentes células se llevó a cabo con ayuda del programa Adobe Photoshop® CS4, y de acuerdo con el protocolo descrito por Baumgardt (Baumgardt et al., 2007). Siempre que se compararon niveles de expresión, tanto las CNVs controles como las mutantes fueron tratadas y analizadas en la misma preparación.

6. Análisis estadístico de los datos.

El análisis estadístico se realizó con ayuda del software Excel. La comparación de las medias en los distintos fenotipos se llevo a cabo mediante una prueba T-Student con dos colas, asumiendo igualdad de varianzas.

Una vez analizado los datos, las gráficas se realizaron haciendo uso del software GraphPad Prism.

RESULTADOS

Apartado I de Resultados:

Estudio del patrón de expresión de Capa en *Drosophila melanogaster*.

1.1 Caracterización del patrón de expresión del neuropéptido Capa en la Cuerda Nervios Ventral (CNV) de *Drosophila melanogaster*.

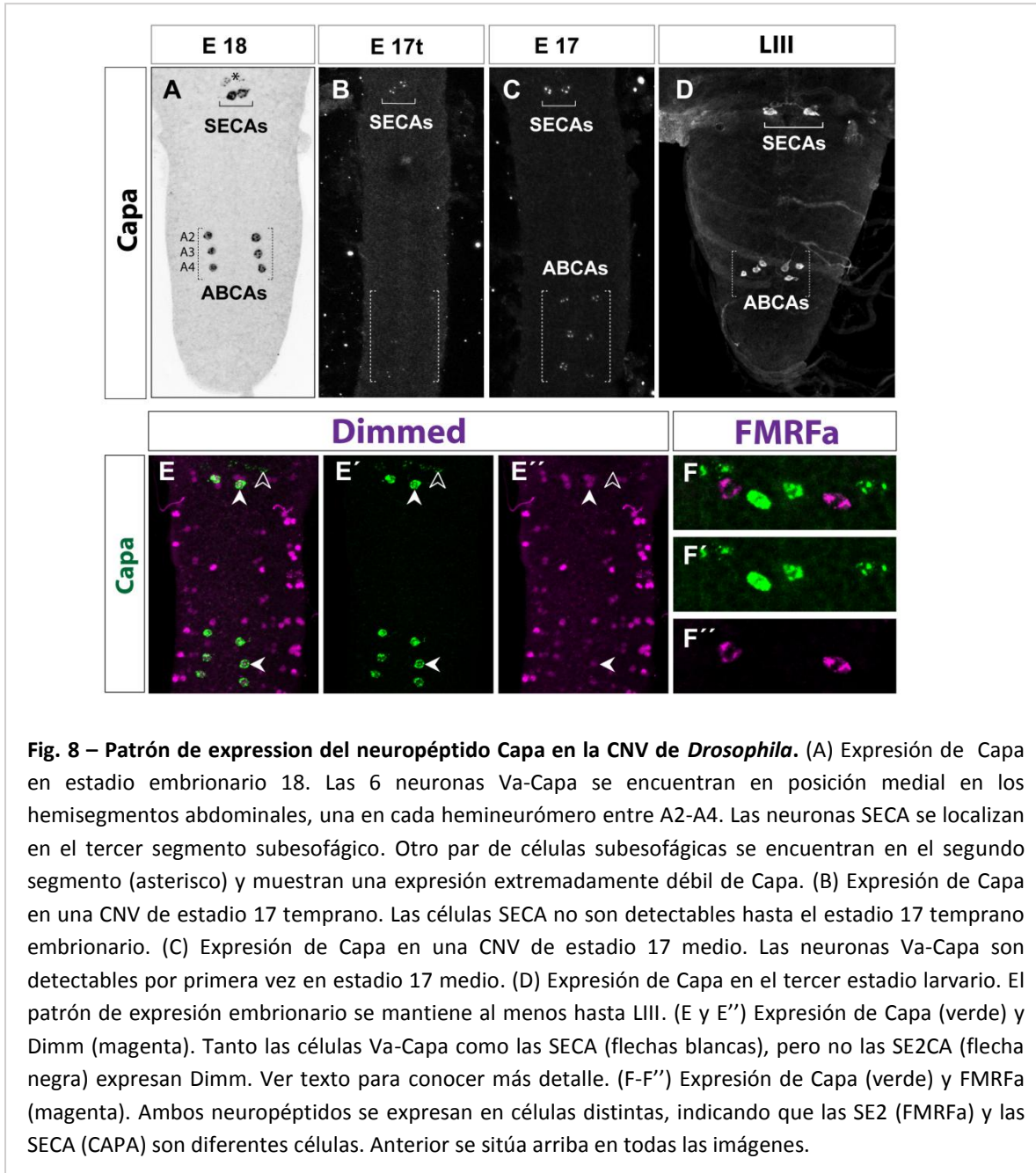
Para el estudio del patrón de expresión del neuropéptido Capa, se hizo uso del anticuerpo policlonal que reconoce al propéptido Capa (pro-Capa; referido a partir de ahora como anticuerpo Capa) (Kean et al., 2002). Su expresión en la Cuerda Nerviosa Ventral (CNV) no era evidente hasta el estadio embrionario 17 (Fig.8C), momento a partir del cual se detecta exclusivamente en 8 células. Este patrón se mantenía constante hasta estadio larvario III (Fig. 8D). Esta expresión tan restringida hizo de este anticuerpo, y de las células que lo expresan, un sistema idóneo para el estudio de los diferentes mecanismos y procesos por los cuales el Sistema Nervioso Central (SNC) es capaz de generar la amplísima diversidad de tipos neurales que le caracterizan.

La expresión de Capa en la CNV se dividía en dos grupos diferenciados de células: Un grupo de dos neuronas localizadas en el tercer segmento subesofágico, nombradas neuronas SECA (subesofágicas de Capa) (Fig. 8A-F); y otro grupo de 6 neuronas situadas una en cada hemineurómero entre los segmentos A2-A4 de la CNV, nombradas como Va-Capa debido a su posición ventral y abdominal (Fig. 8A-D; Kean y col., 2002). Además de las células mencionadas, se observaban un par de neuronas situadas en el segundo segmento subesofágico nombradas *SE2CA*, que presentaban una expresión extremadamente débil del neuropéptido, hecho por el cual descartamos su estudio.

Tanto las neuronas Va-Capa como las SECA, expresaban el gen *dimmed* (*Dimm*), clásicamente definido como gen peptidérgico maestro puesto que su expresión se restringe a neuronas peptidérgicas donde facilita la producción y acumulo de los neuropéptido (Fig. 8E; Gauthier y Hewes, 2006; Hamanaka et al., 2010; Hewes et al., 2003; Park et al., 2008).

Otro aspecto que resultó interesante, es que al realizar una doble tinción utilizando el anticuerpo de Capa y el de FMRFa, se pudo observar que contrariamente a lo publicado por otros grupos anteriormente, las células SECA no expresaban el neuropéptido FMRFa sino que

se trataban de células diferentes con una posición similar dentro del tercer segmento subesofágico(Fig. 8F)(Park et al., 2008).



Como resumen de este conjunto de experimentos, se concluye que el neuropéptido Capa inicia su expresión en la CNV a partir del estadio embrionario 17, en dos grupos de neuronas, unas ventrales y abdominales nombradas como Va-Capa, y otras en el tercer segmento subesofágico, nombradas SECA. Este patrón se mantiene hasta estadio larvario III.

1.2 Identificación del neuroblasto progenitor de las células Va-Capa.

Gracias a los resultados obtenidos por numerosos estudios durante los últimos 20 años, se ha conseguido establecer un patrón de expresión de determinados marcadores, que resulta específico para cada uno de los 30 NBs que componen cada hemineurómero de la CNV. Esta combinación de factores diferentes se mantiene en gran medida en cada una de las células originadas a partir del NB, de tal manera que, conociendo la expresión de dichos marcadores en una determinada neurona, se pudo inferir, con un margen de error pequeño, cuál es su NB progenitor (Bossing et al., 1996; Doe, 1992; Prokop y Technau, 1991; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997).

Dado que la expresión del neuropéptido Capa no es detectable hasta estadios embrionarios tardíos (estadio 17), y dado que hasta el momento no se conocía ningún otro marcador que permitiese la identificación de estas células en estadios tempranos, el estudio de la expresión de dichos marcadores en las células de Capa se realizó en estadio 18.

Las neuronas Va-Capa resultaron expresar el marcador *gsb-lacZ* (un marcador característico de las fila 5 de NBs y de las fila6, además del NB 7-1) y el marcador *wg-lacZ* (marcador de la fila 5) (Fig.9A, B y D). Estos datos sugieren fuertemente que el NB progenitor de las neuronas Va-Capa pertenece a la fila 5 de NBs.

Dado que la migración neuronal es reducida en la CNV y las neuronas Va-Capa se encuentran en una posición medial dentro del territorio de expresión de *wg-lacZ*, los NB 5-1, 5-2 y 5-3 parecían ser los mejores candidatos para ser el NB progenitor de dichas neuronas. Sin embargo no se podían descartar otros NBs de la fila 5, por lo que se procedió al estudio de la expresión de otros marcadores. Uno de ellos fue *ladybird-early (K)-Gal4 (lbe(k)-Gal4)*, una construcción genética en la que la expresión del *Gal4* es dirigida por un fragmento de 2-kb, llamado K, situado 5-kb *upstream* del sitio de iniciación de la transcripción del gen *ladybird-early (lbe)* (Baumgardt et al., 2009; De Graeve et al., 2004). *lbe(K)-Gal4* se expresa en la totalidad de las células del linaje del NB 5-6, a diferencia de lo que ocurre con *lbe-lacZ*, que se expresa en tan solo un pequeño grupo de células del linaje del NB 5-6 y del NB 5-3. Nuestros resultados muestran que las neuronas Va-Capa no expresan el marcador específico del linaje del NB 5-6, *lbe(K)-Gal4*, por lo que descartamos dicho NB como posible progenitor de estas neuronas (Fig.9E).

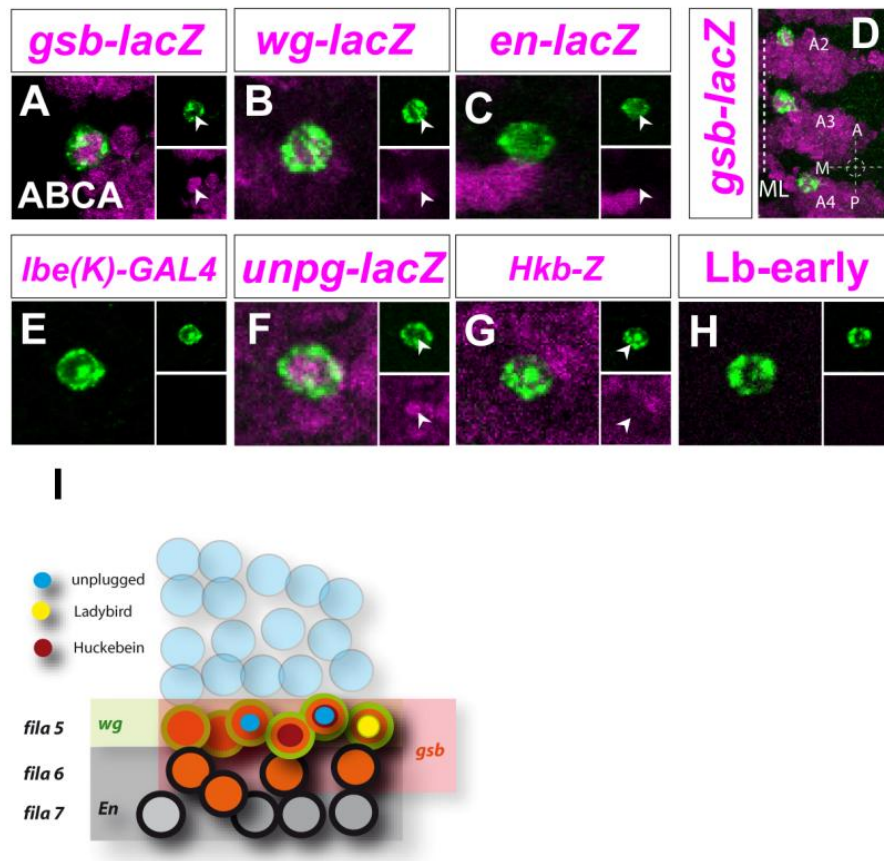


Fig. 9 – Las neuronas Va-Capa parecen ser generadas por el NB 5-3. (A-H) Expresión de Capa (verde) y de diferentes marcadores de NB progenitores (magenta): *gsb-lacZ* (A y D), *wg-lacZ* (B), *en-lacZ* (C), *lbe(K)-Gal4* (E), *unpg-lacZ* (F), *hkb-lacZ* (G), y *Lbe* (H). (A-H) Las Va-Capa expresan *gsb*, *wg* y *unpg*, pero no *en*, *Hkb*, *Lbe* ni *lbe(K)*. (D) Las neuronas Va-Capa muestran una localización medial dentro de la fila 5 (ML, línea media; M, medial; L, lateral; A, anterior; P, posterior). (I) Esquema que resume los marcadores de los posibles NB progenitores. Ver genotipos más arriba. Anterior se sitúa arriba en todas las imágenes.

Por el contrario, las neuronas Va-Capa sí resultaron expresar *unplugged-lacZ* (*unpg-lacZ*), construcción genética cuya expresión caracteriza a los NB 5-3 y NB 5-5 (Fig.2.F). Para poder distinguir entre estos dos NBs, se hizo uso del marcador *hucklebein-lacZ* (*hkb-lacZ*), ya que tan solo el NB 5-5, y no el NB 5-3, se caracterizan por su expresión. Los resultados obtenidos, en los que no se encontró expresión de dicho marcador (Fig.9G), además de las evidencias sobre su posición relativa en la banda de expresión de *wg-lacZ*, sugieren fuertemente que el NB progenitor de las neuronas Va-Capa es el NB5-3.

Dado que *ladybird-early* (*lbe*)-*Gal4* dirige la expresión del gen reportero a un subconjunto específico de células pertenecientes al linaje del NB 5-3 (De Graeve et al., 2004), se quiso averiguar si las neuronas Va-Capa pertenecían a dicho subconjunto, o por el contrario

pertenecían a un subconjunto diferente de neuronas dentro del linaje del Nb 5-3. La ausencia de expresión de este marcador en estas células evidenció que la segunda hipótesis era la correcta (Fig.9H).

Los resultados obtenidos en los experimentos anteriormente mencionados, sugieren que el NB 5-3 es el progenitor de las neuronas Va-Capa de los segmentos A2-A4

1.3 Identificación de los genes temporales implicados en la especificación de las células Va-Capa.

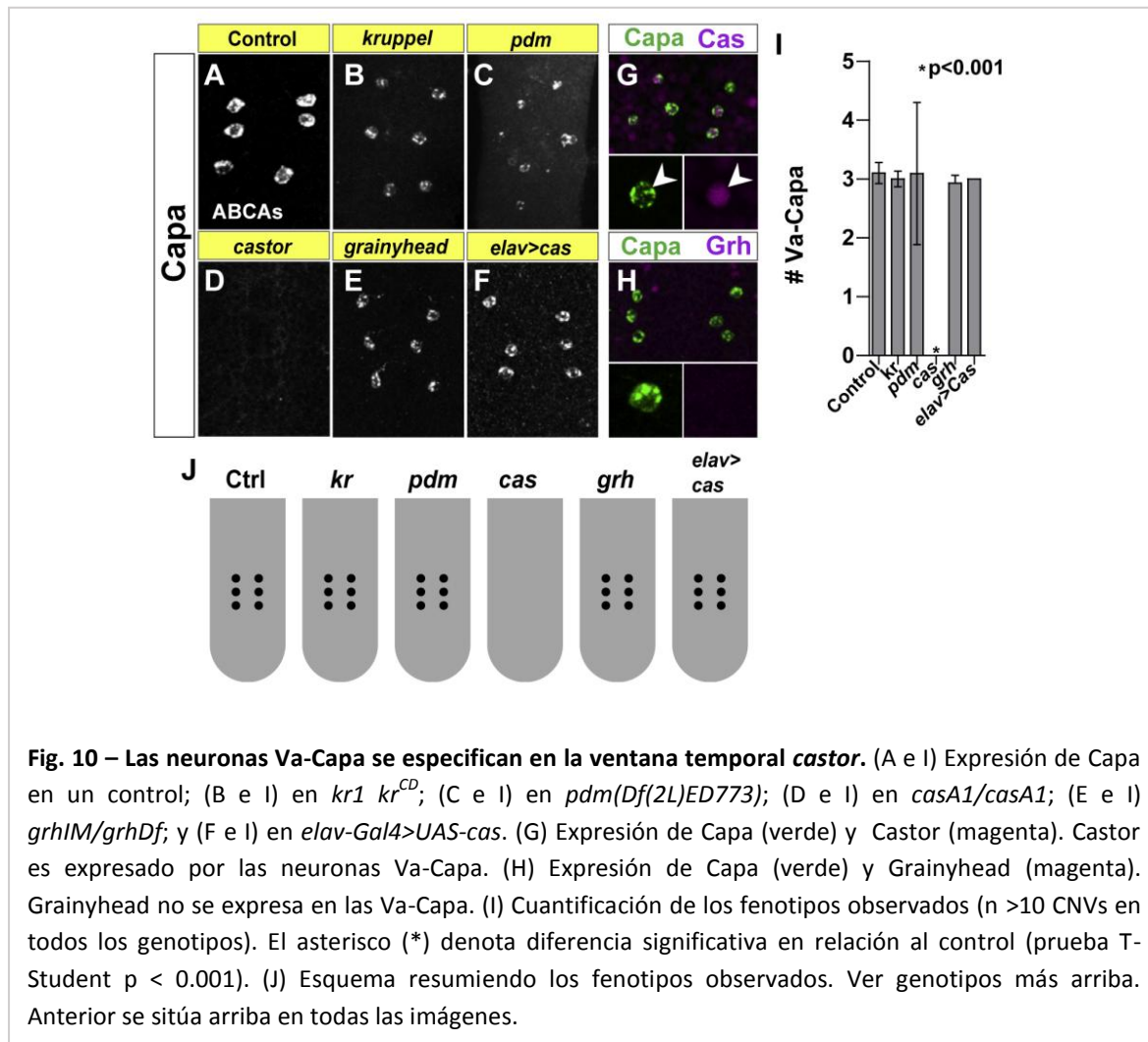
Cuando un NB se divide asimétricamente para dar lugar a otro NB y una célula madre ganglionar (CMG), esta última heredará la expresión del gen temporal que está expresando el NB en ese momento (Isshiki et al., 2001); ver apartado “Introducción”). Este hecho, dota a cada CMG de una cierta identidad diferencial con respecto al resto de CMGs creadas por el mismo NB, pero en un tiempo diferente.

Los genes temporales son imprescindibles para la correcta especificación de cada CMG y de las células que de ella se originan. Por tanto, en individuos mutantes homocigotos para un determinado gen temporal, las CMGs y sus células hijas que normalmente se caracterizan por la expresión de dicho gen, no se especificarán correctamente. Se estudió la expresión de Capa en las neuronas Va-Capa en mutantes para cada uno de los genes temporales, con el objetivo de inferir cuál o cuáles de ellos son necesarios para su correcta especificación, o lo que es lo mismo, en qué ventana temporal nacen estas células. Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la figura 10.

Capa se expresaba en ausencia de todos los genes temporales excepto en ausencia de *cas*. En estos mutantes, se observó una ausencia total del neuropéptido, lo que sugirió que la ventana temporal en la que se originan las células Va-Capa es *cas*. Para reforzar esta hipótesis, se analizó la expresión del anticuerpo anti-Cas, que resultó ser muy evidente en las células Va-Capa (Fig. 3G). Se obtuvo idéntico resultado haciendo uso de *cas-Gal4*, lo que definió a este *Gal4* como un *driver* idóneo a la hora de dirigir la expresión de diferentes *UAS* en estas células (datos no mostrados).

Desafortunadamente, no fue posible examinar la expresión de Capa en mutantes *hb* debido a que los individuos mutantes homocigóticos para este gen mueren antes de alcanzar el estadio

17, a pesar de haber utilizado un alelo mutante en el que *hb* sólo desaparece en la CNV (*hb^{P1}* *hb^{FB}*; (Isshiki et al., 2001). Por este motivo se intentó bloquear la traducción del ARN mensajero de *hb*, expresando un *UAS-hb* ARNi desde diferentes *drivers*: *elav-Gal4*, *driver* pan-neural que dirige la expresión a todas las neuronas del SNC (Campos et al., 1987) y *pros-Gal4*, que produce una expresión muy importante en las CMGs del SNC y cuya expresión se hereda de manera transitoria a las neuronas hijas. En ninguno de los dos casos se consiguió que los niveles de expresión de la proteína (detectados con el uso de anticuerpo) disminuyeran con respecto al control, incluso en combinación con *UAS-DicerII*, construcción que facilita el funcionamiento de los ARN interferentes (datos no mostrados).



En trabajos anteriores se describió como, en ciertos casos, la simple sobreexpresión del gen temporal es capaz de originar neuronas ectópicas, aparentemente iguales a las creadas en su ventana (Benito-Sipos et al., 2010). Para testar esta posibilidad en las neuronas Va-Capa, se

expresó *UAS-cas* desde *elav-Gal4* (Fig. 10G, J e I), y no se observó fenotipo en ningún caso. También se utilizó el *driver pros-Gal4*, obteniendo idéntico resultado (datos no mostrados).

Los resultados expuestos en este apartado, sugieren que las neuronas Va-Capa son originadas en una ventana temporal *cas*. La mera sobre-expresión de este gen no es capaz de crear células ectópicas de Capa, ya que, posiblemente, forme parte de un código de especificación más amplio.

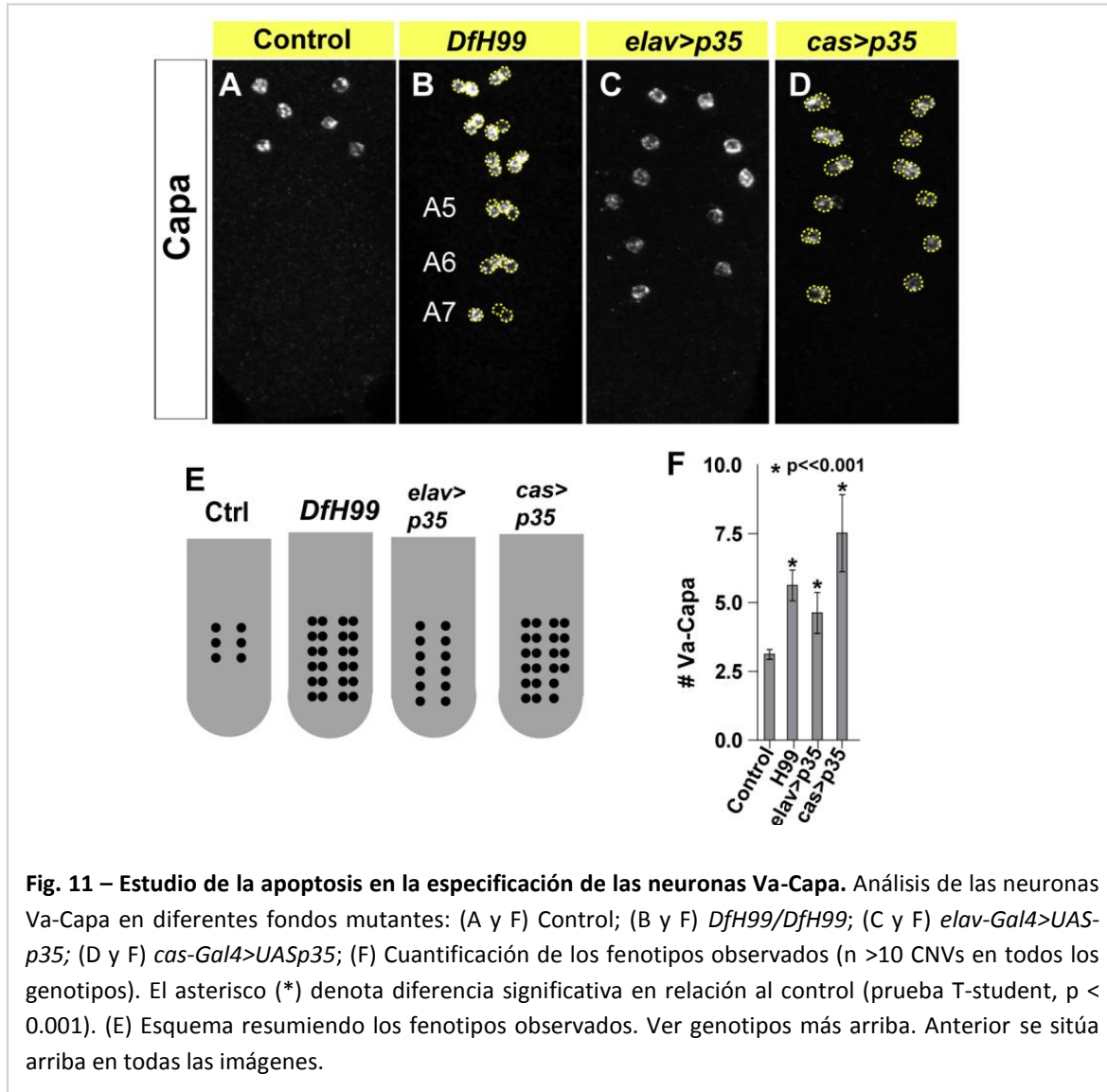
1.4 Neuronas Va-Capa y muerte celular programada.

La apoptosis es un proceso celular ampliamente extendido en el desarrollo en general, y en el del sistema nervioso en particular. Uno de los eventos del desarrollo neural en el que este mecanismo tiene mayor relevancia, es en la división de las células madre ganglionares. Cada CMG sufre una única división asimétrica en la que cada célula resultante se diferencia como neurona, célula de la glía, o sufre un proceso de muerte celular programada (MCP) (Karcavich y Doe, 2005). Varios de los linajes peptidérgicos hasta la fecha mejor conocidos, como son los de las neuronas Leukokinérgicas y Corazoninérgicas, sufren apoptosis para establecer su patrón de expresión definitivo en el embrión (Benito-Sipos et al., 2010; Karcavich y Doe, 2005). En estos casos, la división de la CMG que da lugar a la célula peptidérgica, da lugar también a otra célula idéntica, que en los primeros momentos después de la mitosis, muere.

Por ello se estudió la posibilidad de que la CMG que genera la célula Va-Capa en cada hemineurómero, generase también una célula hermana que sufriese apoptosis temprana. Con este objetivo, se comprobó la expresión del neuropéptido de Capa en un escenario en el que la apoptosis se encuentra bloqueada, como es el caso de los embriones homocigóticos para la deficiencia cromosómica *Df(3L)H99 (H99)*. Esta deficiencia descubre los genes pro-apoptóticos, *reaper (rpr)*, *grim* y *head involution defective (hid)*, (Bergmann et al., 2003), de tal manera que los individuos homocigóticos carentes de estos tres genes muestran una total falta de apoptosis (White et al., 1994).

En los resultados observados al estudiar embriones mutantes homocigóticos para *H99*, se puede observar cómo se generan dos neuronas Va-Capa en cada hemisegmento, lo que demuestra que en condiciones silvestres la CMG genera dos neuronas idénticas y que una de ellas muere por apoptosis en estadios tempranos. (Fig. 11B y F). Sorprendentemente, aparece también una pareja de neuronas que expresan Capa en cada uno de los hemineurómeros de

los segmentos A5-A7, donde normalmente no se observa neurona que lo haga. Este resultado puede explicarse por diferentes teorías: en individuos silvestres los NB 5-3 presentes exclusivamente en los segmentos A5-A7 sufren apoptosis y no generan ni la CMG ni las neuronas Va-Capa, o bien el NB sí se genera pero es la CMG la que sufre procesos de muerte celular, o directamente es la neurona la que a nivel post-mitótico muere. Además, se demostró que la apoptosis se producía a nivel post-mitótico, es decir, que las neuronas se llegaban a generar, y posteriormente morirían. (Ver el apartado 2.1 de Resultados para más información).



Para profundizar en el estudio de los procesos de muerte celular en el sistema de neuronas Va-Capa, se expresó la proteína P35 del baculovirus, que actúa como inhibidor de las caspasas (Hay et al., 1994), desde diferentes *drivers*: *elav-Gal4* y *cas-Gal4*. Los resultados obtenidos en cada caso fueron diferentes. Al expresar P35 desde *cas-Gal4* la expresión de esta proteína era

capaz de impedir la muerte de las neuronas Va-Capa de los segmentos A5-A7, pero además, en consonancia con lo observado en la deficiencia del gen *H99*, la de las neuronas hermanas de las Va-Capa (Fig. 4C, E y F). Al hacerlo desde *elav-Gal4*, solo las neuronas Va-Capa de los segmentos posteriores sobrevivían, pero no las neuronas hermanas de Va-Capa (Fig. 4D, E y F). La explicación más plausible era que la muerte de las células hermanas Va-Capa, precedía temporalmente a la muerte de las neuronas Va-Capa de los segmentos posteriores A5-A7. Puesto que *cas-Gal4* se expresaba ya en CMG y neurona recién nacida, la expresión de P35 se producía a tiempo para impedir la MCP, pero en cambio, en el caso de la sobreexpresión desde *elav-Gal4*, la apoptosis sucede antes de que se pudiera producir la proteína P35.

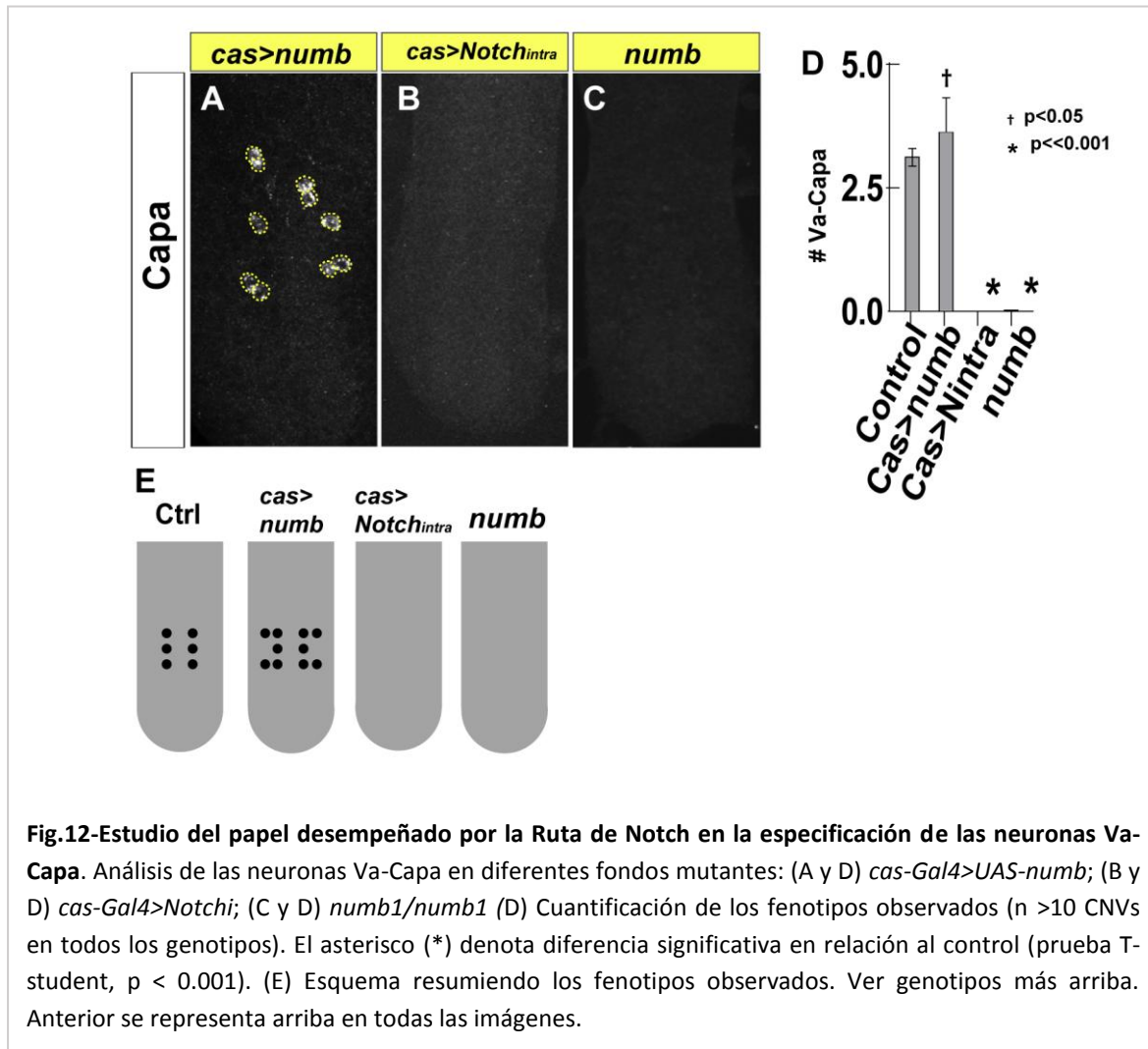
Como resumen de este apartado, se concluye que el NB 5-3 genera la CMG y las neuronas Va-Capa en los segmentos A5-A7, pero sufren apoptosis temprana. Además, las neuronas hermanas Va-Capa mueren por apoptosis poco después de nacer. En escenarios en los que la MCP está inhibida, aparecen por tanto 2 neuronas Va-Capa en cada hemineurómero entre A2 hasta A7.

1.5 Implicación de la ruta de Noth en la especificación de las células Va-Capa.

En el proceso de división asimétrica de las CMGs, la ruta de señalización Notch juega un papel fundamental para diferenciar los destinos adquiridos por las dos células hijas. En muchos casos, controla los procesos de muerte celular que, a nivel post-mitótico, sufren las neuronas hijas. Este hecho ha sido también constatado en varios linajes de células peptidérgicas (Benito-Sipos et al., 2010; Karcavich y Doe, 2005; Lundell et al., 2003; Schuldt y Brand, 1999; Skeath y Doe, 1998; Spana y Doe, 1996), por lo que se decidió estudiar el papel de la ruta de señalización Noth en la especificación de las células Va-Capa, y para ello se analizó la expresión de Capa en un fondo mutante en el que la la ruta Notch se ve inactivada.

Desafortunadamente, la muerte de los individuos homocigóticos para las mutaciones clásicas *sanpodo* y *mastermind* se produce antes del estadio 17, cuando la expresión de Capa es por primera vez detectable. Por este motivo, para conocer el fenotipo producido en la falta de función de la Ruta de Notch en las neuronas Va, se analizó la expresión de *UAS-numb* dirigida desde *cas-Gal4*. Numb es una proteína asociada a membrana que actúa como antagonista de la ruta de Noth a la hora de especificar el destino de una de las dos células hermanas (Spana

et al., 1995). En los individuos en los que se sobreexpresa Numb, se observó una tendencia a presentar duplicaciones en las células Va-Capa (Fig. 12A y D).



Posteriormente se analizó el efecto producido por la activación de la ruta de Notch mediante la sobre-expresión de Notch intra, uno de los efectores finales de la ruta (Rebay et al., 1993; Struhl et al., 1993), desde el driver *cas-Gal4* (*cas-Gal4>UAS-Nintra*). En consonancia con los resultados obtenidos en la falta de función de Notch, en este caso se observa el fenotipo contrario, es decir, una total ausencia de las neuronas Va-Capa.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este apartado, se concluye que la Ruta de señalización de Notch tiene un papel determinante en la especificación del destino de las neuronas Va-Capa. La expresión de los destinos de las neuronas Va-Capa requiere la inactivación de la Ruta de Notch (Notch-OFF) mientras que la activación de la Ruta (Notch-ON) determina el destino de muerte celular.

1.6 Identificación de otros genes requeridos para la especificación de las neuronas Va-Capa.

La especificación de un determinado destino celular es un proceso multifactorial complejo, en el que intervienen por lo general gran número de genes, muchos de los cuales lo hacen de manera combinada en diferentes momentos. Entre estos genes se establece una jerarquía epistática determinada, lo que se traduce en una jerarquía de activación/represión concreta entre ellos (Allan et al., 2005; Baumgardt et al., 2007; Certel y Thor, 2004; Garces y Thor, 2006).

Para poder identificar genes involucrados en la especificación del destino de las neuronas Va-Capa, se llevó a cabo un *screening* en el que se analizó la expresión del anticuerpo de Capa, en las neuronas Va, en embriones mutantes para genes cuya expresión se produce en la CNV (Brody et al., 2002). El estudio se realizó en estadio embrionario 18 (Consultar “Anexo I”).

Se identificaron gran número de genes en los que el patrón de expresión de Capa no se veía afectado: *apterous (ap)*, *atonal (ato)*, *beadex (bx)*, *crooked legs (crol)*, *dimmed (dimm)*, *defective proventriculus (dve)*, *eagle (eg)*, *elbow/noc ocelli (el/noc)*, *empty spiracles (ems)*, *eygone (eyg)*, *hearthless (htl)*, *Jumeaux (jumu)*, *ken y Barbie (ken)*, *knirps (kni)*, *lim3*, *nab*, *panier (pnr)*, *schnurri (shn)*, *squeeze (sqz)*, *shuttle craft (stc)*, *seven up (svp)*, *rhea*, *target of Poxn (tap)*, *tonochaetae (ton)*, *tailup (tup)*, *vestigial (vg)*, *vein (vn)* (Anexo 1); otros en los que el número de células Va-Capa se veía significativamente aumentado respecto al control: *chip*, *osa*, *rotund (rn)*, *fork head (fkh)*, *scribble (sbb)*, *dachshund (dac)* y *klumpfuss (klu)* (Tabla I); y otros en los que el número disminuía en manera significativa: *collier (col)*, *daughterless (da)*, *zinc finger homeodomain 2 (zhf2)*, *fushi tarazu (ftz)* y *grain* (Anexo I).

De entre los genes en los que se ve aumentado el número de células Va-Capa resulta de especial interés *klu* debido al gran número de duplicaciones que presenta. Por este motivo decidimos iniciar el estudio de su fenotipo en profundidad y los resultados se muestran en los apartados de 4.2, 4.3, 4.4 y 4.5 de “Resultados”. También el papel de los genes *sbb* y *dac* fue estudiado en profundidad, y los resultados obtenidos se encuentran el apartado de 4.1 de “Resultados”. Entre los genes en los que el número de células se ve disminuido destacan *Grunge* y *hedgehog* en los que se aprecia una falta casi total de células Va-Capa. De acuerdo con estudios realizados anteriormente por otros grupos, estos genes tienen un papel importante en la especificación de los NB, por lo que en este estudio no se profundizó en el análisis de su fenotipo, al no tratarse de un papel post-mitótico.

Concluimos que la expresión del neuropéptido Capa se ve modificada en mutantes homocigotos para diferentes genes. Algunos de ellos disminuyen el número de células presentes, como es el caso de *Grunge* y *hedgehog*, y en otros el número se ve aumentado, como ocurre en los mutante *klumpfuss*, *dachshund* y *scribble*.

1.7 Transporte retrógrado y la ruta BMP en las Neuronas Va-Capa.

Para algunas neuronas peptidérgicas, la activación de la ruta de señalización BMP (“*Bone Morphogenic Proteins*”) resulta indispensable para la correcta expresión del neuropéptido. En trabajos anteriores, se han descritos sistemas neuronales en los que el transporte retrógrado, es decir, desde el axón hasta el soma, resulta imprescindible para hacer llegar el ligando Glass Bottom Boat (Gbb) desde el órgano neuronal (ONH; Allan et al., 2003, 2005). Por este motivo, la interrupción del transporte retrógrado resultaba en la inactivación de la ruta BMP

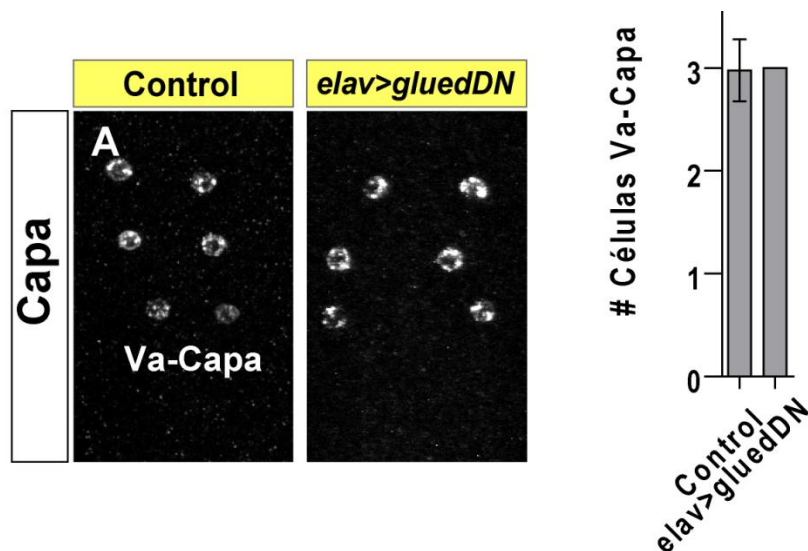


Fig.13-El transporte retrógrado en la especificación de las neuronas Va-Capa. Expresión de Capa en las neuronas Va-Capa en : (A y C) Control; (B y C) *elav-Gal4>gluedDN*; (C) Cuantificación de los fenotipos observados (n >10 CNVs en todos los genotipos). El asterisco (*) denota diferencia significativa en relación al control (prueba T-student, p < 0.001). Anterior se representa arriba en todas las imágenes.

Dado que las neuronas Va-Capa parecen inervar el ONH y dado que Capa ha sido identificado en el peptidoma del órgano neurohemal asociado a la CNV, se analizó la posibilidad de que el transporte retrógrado fuera necesario para la correcta expresión de Capa en estas células. Para

ello, se interrumpió el transporte retrógrado axonal expresando una versión que actúa como dominante-negativo de 150/glued (*UASgluedDN*), que es un componente de complejo motor Dinactina. Al dirigir este UAS desde *elav-Gal4* no se observó ninguna alteración la expresión del neuropéptido Capa (Fig.13 A, B y C), por lo que se deduce que el transporte retrógrado no es necesario para la correcta especificación de las neuronas Va-Capa.

Se concluye por tanto que la especificación de las neuronas Va-Capa no necesita transporte retrógrado para poder desarrollarse con normalidad.

Apartado II de Resultados:

El sistema de neuronas homólogas Va.

2.1 El neuropéptido Capa dentro del sistema Va.

En 2011, durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, un trabajo llevado a cabo por el grupo de Stefan Thor (Suska et al., 2011) demostró que células similares a las Va- Capa, aparecen en estadio 15 tardío en todos los segmentos de la CNV. En estadio embrionario, antes de que se inicie la expresión del neuropéptido Capa, estas células podían ser identificadas puesto que eran las únicas que expresan de manera conjunta el co-factor Dachshund (Dac) y la proteína pro-peptidérgica Dimmed (Dimm) en la región ventral y abdominal (neuronas Va). También en los segmentos torácicos (T1-T3) se generaban células similares con igual posición, pero a diferencia de las células abdominales, no expresan Dac. En el estadio 16 temprano las células torácicas dejan de expresar Dimm, y por tanto no pueden ser monitorizadas lo que imposibilita el estudio de su posterior proceso de diferenciación (Fig.14).

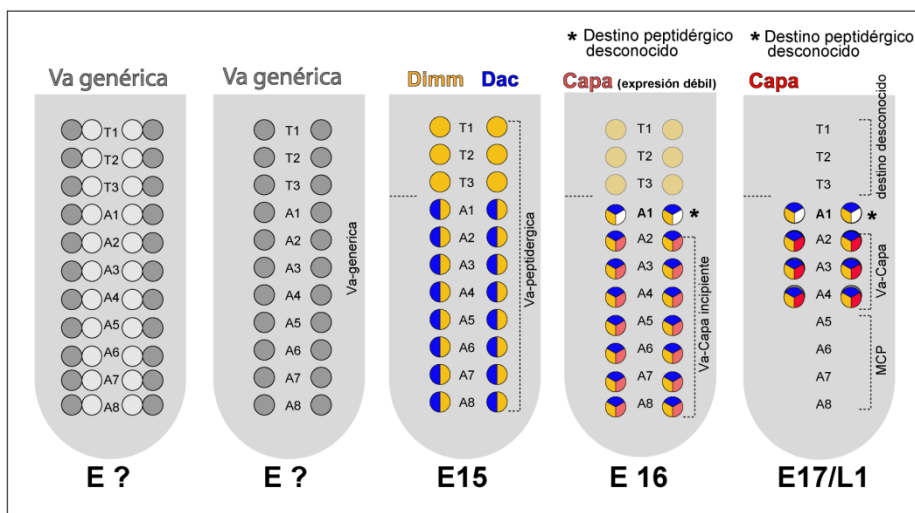


Fig.14- Esquema del desarrollo de las neuronas Va en la CNV. En estadios embrionarios tempranos, una pareja de neuronas Va aparecen en cada hemisegmento torácico y abdominal de la CNV. Más tarde, una de las células hermanas muere y, al final del estadio 15, una única neurona permanece en cada hemisegmento. En estadio 16 las neuronas torácicas dejan de expresar Dimm, y las de los segmentos A5-A8 sufren apoptosis. De las 8 células Va aún localizables por la expresión de Dimm y Dac en el estadio 17, 6 de ellas (las de los segmentos A2-A4) comienzan a expresar el neuropéptido Capa, mientras que el destino adquirido por las neuronas Va se desconoce. Ver texto para más detalle. (Resultados obtenidos en esta tesis junto con datos publicados por el grupo de Stefan Thor; Suska et al., 2011)

Poco más tarde, en estadio 16, las neuronas de los segmentos posteriores (A5-A8) mueren. En consonancia con los resultados obtenidos tras analizar la expresión de Capa en homocigotos para la deficiencia *H99* (apartado 1.4 de “Resultados”) estas neuronas de segmentos posteriores poseen capacidad de diferenciarse y expresar Capa en un contexto en el que la apoptosis se ve suprimida, pero en condiciones normales, sufren procesos de muerte celular programada en estadio 16.

Al principio del estadio embrionario 17, cuatro parejas de neuronas entre los segmentos A1-A4 sobreviven. Las correspondientes a los segmentos A2-A4 inician la expresión del neuropéptido Capa, a diferencia de lo que ocurre con la pareja de neuronas presente en el segmento A1, de la que tan solo se conocía su expresión de Dimm y Dac.

2.2 La neurona Va-A1 es peptidérgica y expresa los neuropéptidos DH31 y Ast-A.

La neurona Va-A1 no expresaba Capa, a diferencia de lo que ocurre con las neuronas de A2-A4. Aunque, dada su expresión del gen pro-neurosecretor *dimmed*, se le suponía un destino peptidérgico, su proceso de especificación terminal resultaba una incógnita.

Para iniciar el estudio de su diferenciación, primero se comprobó si las neuronas A1 seguían presentes pasado el estadio 18 embrionario o si por el contrario, sufrían apoptosis. Para ello, se realizó una doble tinción anti-Dimm y Dac en el estadio larvario III, y en ella se observó la presencia de las neuronas Va de los segmentos A1-A4 (Fig.15A).

Para determinar si realmente el proceso de diferenciación de dichas neuronas culminaba con la adquisición de un destino neuropeptidérgico, como sugería la expresión de Dimm, se realizó un *screening* usando una batería de anticuerpos para diferentes neuropéptidos, y comprobando su posible expresión en la neurona Va-A1. Los resultados indicaron que esta pareja de neuronas Va del segmento A1 expresaba tanto el neuropéptido Allostatina-A (Ast-A) como la Hormona Diurética-31 (DH31) (Fig.15 A, B y E). Puesto que ninguna otra de las neuronas Va excepto la Va de A1, resultó expresar estos neuropéptidos, se nombró a dicha pareja de neuronas como Va-DH31.

Se concluye por tanto que las neuronas Va del segmentos A1 se encuentran presentes al menos hasta tercer estadio larvario. La neurona Va del segmento A1 expresa los neuropéptidos Allostatina-A (Ast-A) y Hormona Diurética-31 (DH31) y recibe por tanto el nombre de Va-DH31.

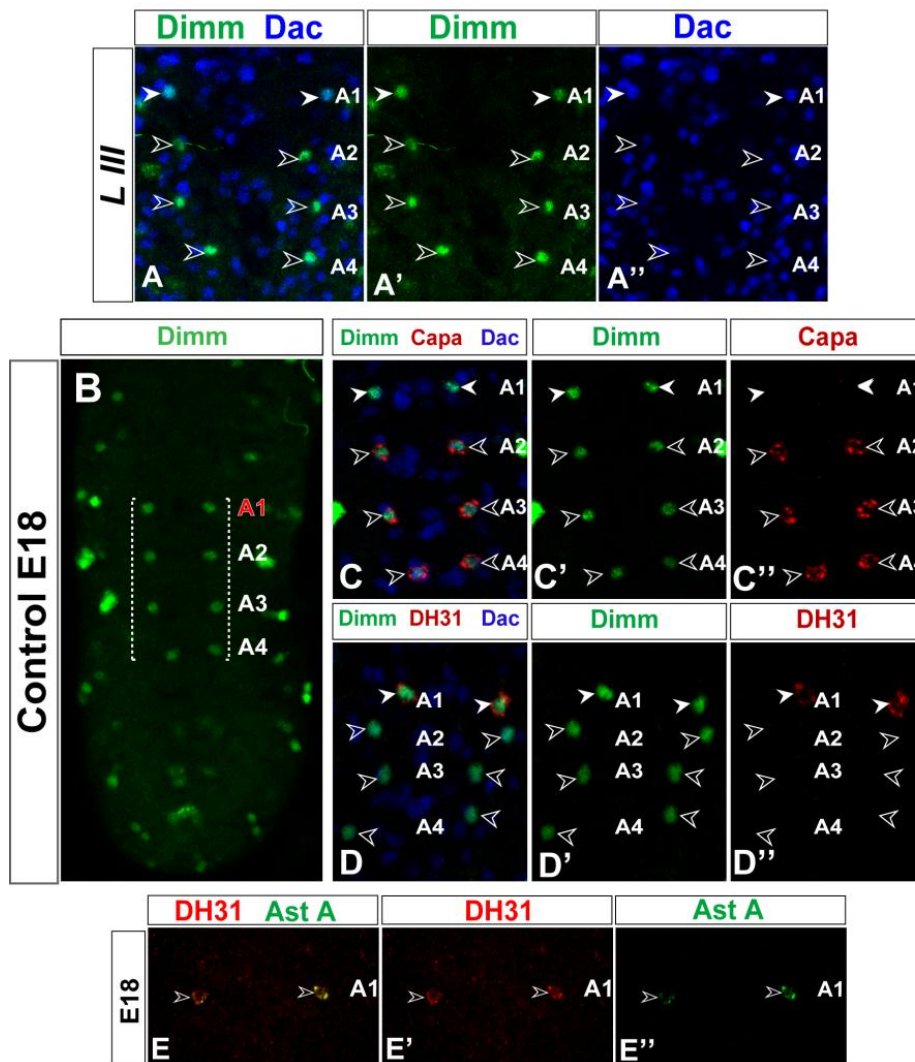


Fig.15-Expresión de DH31 y Ast A en las neuronas Va-A1. (A) Co-expresión de Dimm (verde) y Dac (azul) en una larva III control. Las neuronas Va-Capa están presentes en ese estadio larvario III. (B y C) Expresión de Dimm (verde), Dac (azul) y Capa (rojo) en las neuronas Va de los segmentos A2-A4 en un control en estadio 18. (B y D) Expresión de Dimm (verde), Dac (azul) y DH31 (rojo) en las neuronas Va del segmentos A1 en un control en estadio 18. (E-E'') Co-localización de DH31 (rojo) y Ast-A (verde) en la neurona Va del segmento A1 de un embrión silvestre de estadio 18. Anterior se sitúa arriba en todas las imágenes.

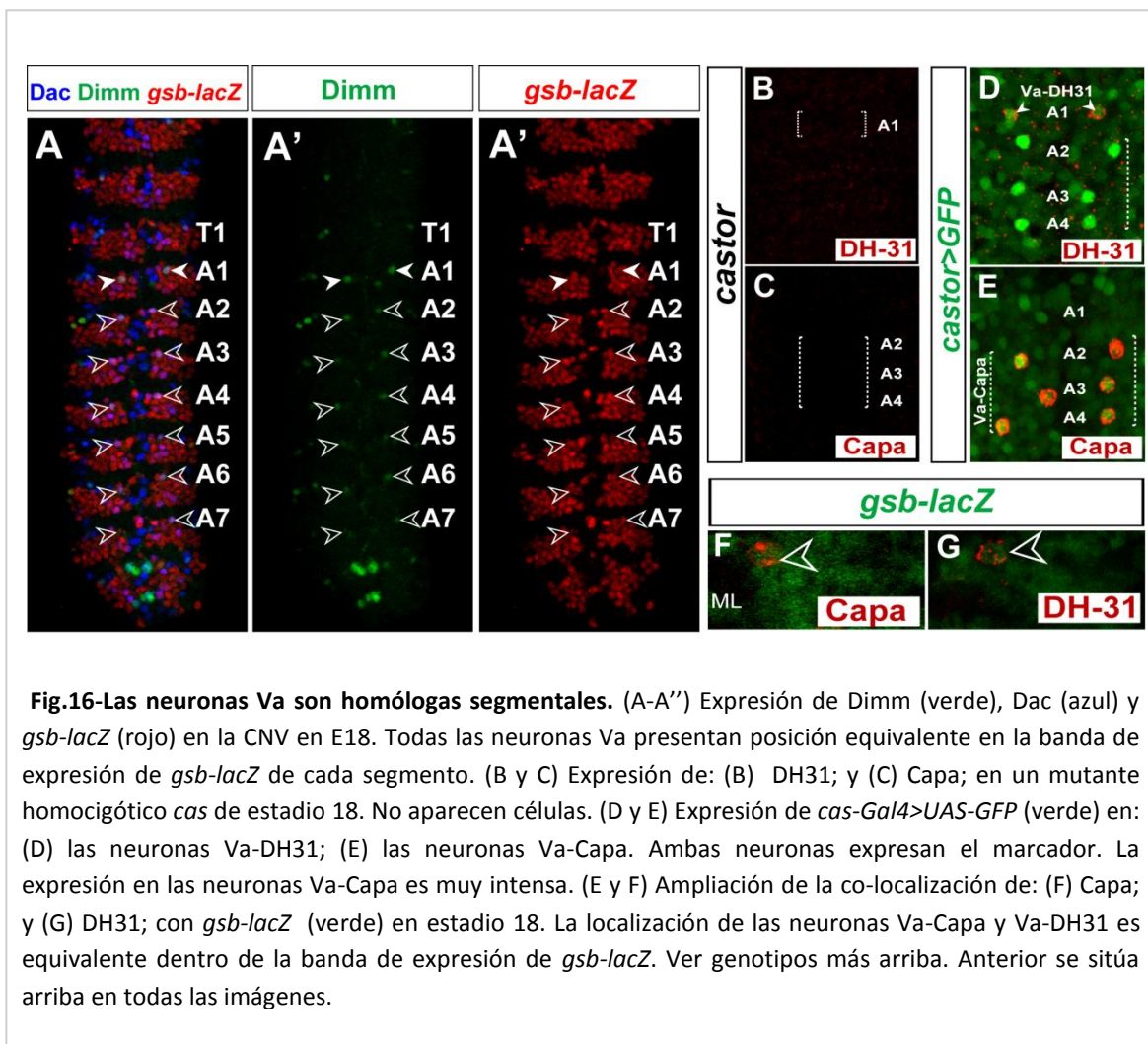
2.3 Las Va son una serie de neuronas homólogas.

De acuerdo con los resultados hasta ahora expuestos, las neuronas Va son células que aparecen en el mismo momento (estadio 15), muestran idéntica posición ventral, y se caracterizan por la expresión de una combinación de marcadores (Dimm y Dac) por la cual pueden ser identificadas de forma inequívoca. Todos los indicios apuntaban a que las neuronas Va eran una serie de células homólogas, es decir, células equivalentes creadas por el mismo NB y en la misma ventana temporal, pero en diferentes segmentos.

Sin embargo, dado que los resultados anteriores indicaban que en diferentes segmentos expresaban diferentes neuropéptidos, se realizó un estudio para comprobar que efectivamente eran neuronas homólogas. En primer lugar se examinó si el NB progenitor de las neuronas Va presentes en A1 era, igual que ocurre en el caso de las neuronas Va-Capa, el NB 5-3 (apartado 1.2 de “Resultados”). Se evaluó la posición de las neuronas Va dentro la zona de expresión de *gooseberry-lacZ* (*gsb-lacZ*), marcador del que se conocía su expresión en la neuronas Va-Capa (apartado 1.2 de “Resultados”). Se observó cómo las neuronas Va de cada segmento de la CNV presentaban siempre una posición anterior y medial dentro de la zona de expresión de *gsb-lacZ*, incluida la neurona Va-DH31 (Fig.16 A, F y G). Para corroborar que, a pesar de expresar distinto neuropéptido, incluso la neurona Va-A1 era homóloga a las neuronas Va-Capa, y que por tanto, provenían del mismo NB, se estudió la expresión de los mismos marcadores genéticos utilizados para determinar el NB progenitor de las neuronas Va-Capa. La expresión de DH31 en la Va-A1 co-localiza con *gsb-lacZ*, *wg-lacZ* y *unpg-lacZ* de la misma manera que lo hace el neuropéptido Capa (datos no mostrados). Combinando estos resultados con los de la posición equivalente de todas las neuronas Va en la zona de expresión de *gsb-lacZ*, se concluyó que tanto Va-Capa como Va-DH31 nacen a partir del NB 5-3 en diferentes segmentos.

En segundo lugar, se quiso analizar si las neuronas Va-DH31 también se originaban en la ventana temporal de Castor (apartado 1.3 de “Resultados”). Para ello, se analizó la expresión del anticuerpo de DH31 en embriones mutantes homocigotos para *castor*, en los que se aprecia una ausencia total del neuropéptido (Fig.16 B y C). Se estudió también la expresión de *cas-Gal4>UAS-GFP* en las neuronas Va-A1, resultando que esta construcción reportera muestra gran intensidad de señal en estas neuronas (Fig.16 D y E).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que la posición de todas las neuronas Va es equivalente en cada segmento, y que las neuronas Va-DH31 se originan a partir del NB 5-3 en la ventana temporal de *castor* igual que lo hacen las neuronas Va-Capa. Por tanto, las neuronas Va son un grupo de neuronas segmentalmente homólogas, que a lo largo del desarrollo, divergen en distintos destinos neuronales, como son la expresión de DH31/Ast-A en A1, la expresión de Capa en A2-A4, y la apoptosis en los segmentos A5-A8. En segmentos torácicos su especificación se desconoce. Se trata del primer caso descrito en el que células homólogas adquieren destinos peptidérgicos distintos.



Apartado III de Resultados:

La acción de los genes Hox en el nuevo sistema de neuronas Va.

3.1 Los diferentes procesos de especificación de las neuronas Va a lo largo del eje A-P son dirigidos por la acción de los genes Hox.

La acción de los genes Hox resulta fundamental en los procesos de diferenciación de la serie de neuronas homólogas Va (Suska et al., 2011). Las neuronas Va de los segmentos A2-A4 se especifican como Va-Capa bajo la influencia del gen *abd-A*, mientras que la muerte programada que sufren las neuronas de los segmentos A5-A8 en el estadio 16, es dirigida por la acción del gen *Abd-B*. En los segmentos torácicos en estadio 15 temprano, ocurre una disminución y posterior finalización de la expresión de Dimm. En este caso *Antp* es el gen responsable del destino adquirido por estas neuronas Va torácicas. Debido a que las neuronas Va torácicas no pueden ser localizadas en estadios más tardíos, la posible identidad adquirida por estas células sigue siendo un misterio (Fig. 17).

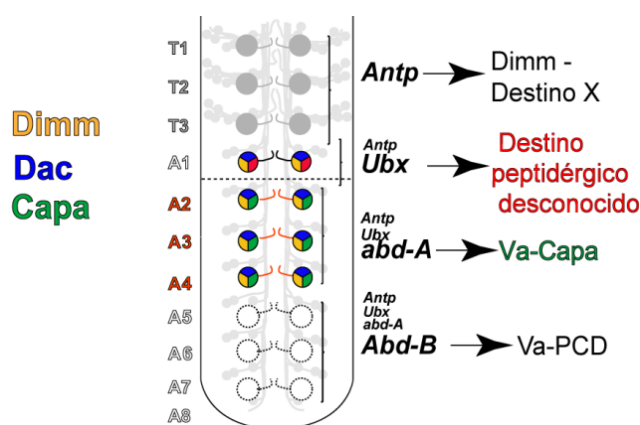


Fig.17-Resumen de la acción de los genes Hox en la especificación de las neuronas Va. El patrón de expresión de expresión Capa en las neuronas Va presente en E18 es resultado de la acción de los genes Hox: En los segmentos A2-A4 es fundamental la expresión de *abd-A*; la apoptosis de las neuronas de los segmentos A5-A8 es dirigida por *Abd-B*; las neuronas Va torácicas presentan alta expresión de *Antp*. La expresión de Dimm y Dac en la neurona de A1 es dependiente de *Ubx*, pero no se conoce la relación de los Hox con la expresión de DH31 (Suska et al., 2011).

En el segmento A1 la expresión de Dimm y Dac en las neuronas Va, es dependiente de la acción de *Ubx* (Suska et al., 2011). Debido, entre otras razones, a que no se conocía el proceso de especificación terminal adquirido por la neurona Va de A1, importantes preguntas sobre la acción de los genes Hox quedaron sin resolver. Tras la identificación de DH31 y Ast-A como neuropéptidos expresados en las neuronas Va de A1, el sistema Va y su relación con los genes Hox pudo ser estudiada en profundidad.

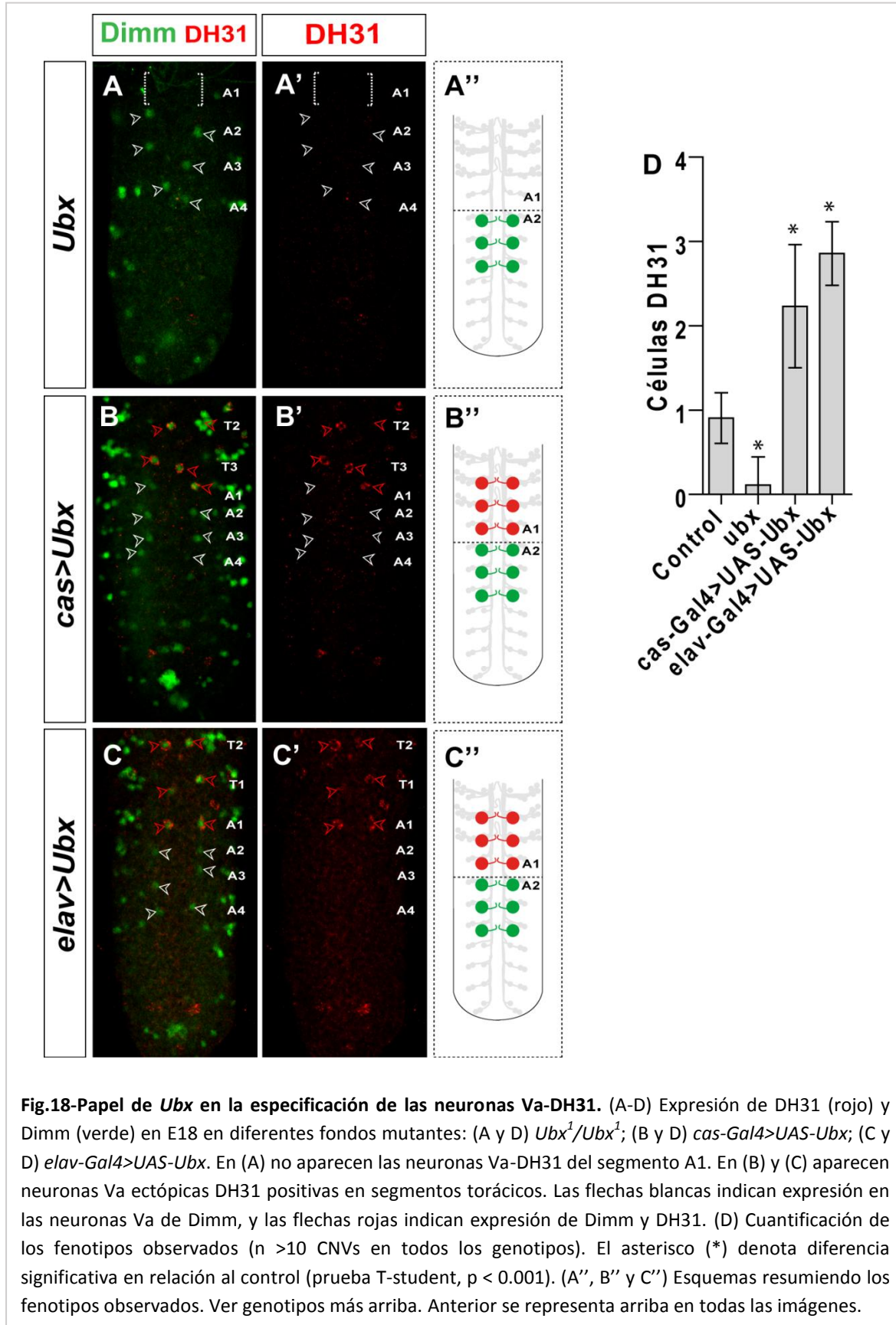
3.2 *Ubx* dirige la diferenciación específica de segmento de la neurona Va-DH31.

La identificación de la expresión de DH31 en la neurona Va-A1 permitió la realización de un análisis detallado sobre cómo, mediante la acción de los genes Hox, se determina el destino específico de segmento en las neuronas Va.

El gen *Ubx* se expresa a muy altos niveles en las Va-DH31 (Suska et al., 2011), por lo que se decidió estudiar el papel que este gen podía desempeñar en la inducción de la expresión de DH31 en dichas neuronas. Se comprobó la expresión de DH-31 en las neuronas Va-A1 de individuos mutantes homocigotos en estadio embrionario 18, observándose una falta de expresión total tanto de Dimm como de DH31 (Fig.18 A y D).

Con el propósito de poder esclarecer si el papel de *Ubx* dentro del linaje ocurría a nivel de NB y/o CMG, o si su actuación era a nivel de neurona (post-mitótico), se expresó el *UAS-Ubx* desde los *drivers cas-Gal4* y *elav-Gal4*. *cas-Gal4* se expresa tanto a nivel de neurona como a nivel de NB y CMG, mientras que el *driver elav-Gal4* se expresa casi exclusivamente a nivel de neurona. Por tanto, comparando los resultados obtenidos a partir de ambos *drivers*, se podría deducir el momento en el cual *Ubx* desempeña su papel principal. Los resultados obtenidos fueron iguales usando ambas líneas de *Gal-4*. En ambos casos se observaban células que expresan DH31 de manera ectópica en los segmentos torácicos T2-T3, que presentaban una localización igual a la propia de las neuronas Va (Fig. 18 B, C y D). Estas neuronas, además, expresaban los marcadores característicos de las neuronas Va, como son Dimm y Dac, lo que demostraba la transformación de las neuronas de estos segmentos torácicos en neuronas similares a las Va-DH31 de A1. Por otro lado, el hecho de que se obtuvieran resultados equivalentes desde ambos *drivers* sugiere que *Ubx* desempeñaba su papel fundamental a nivel de neurona, es

decir, de forma postmitótica, puesto que era el único marco de expresión común que compartían ambos *Gal-4*.



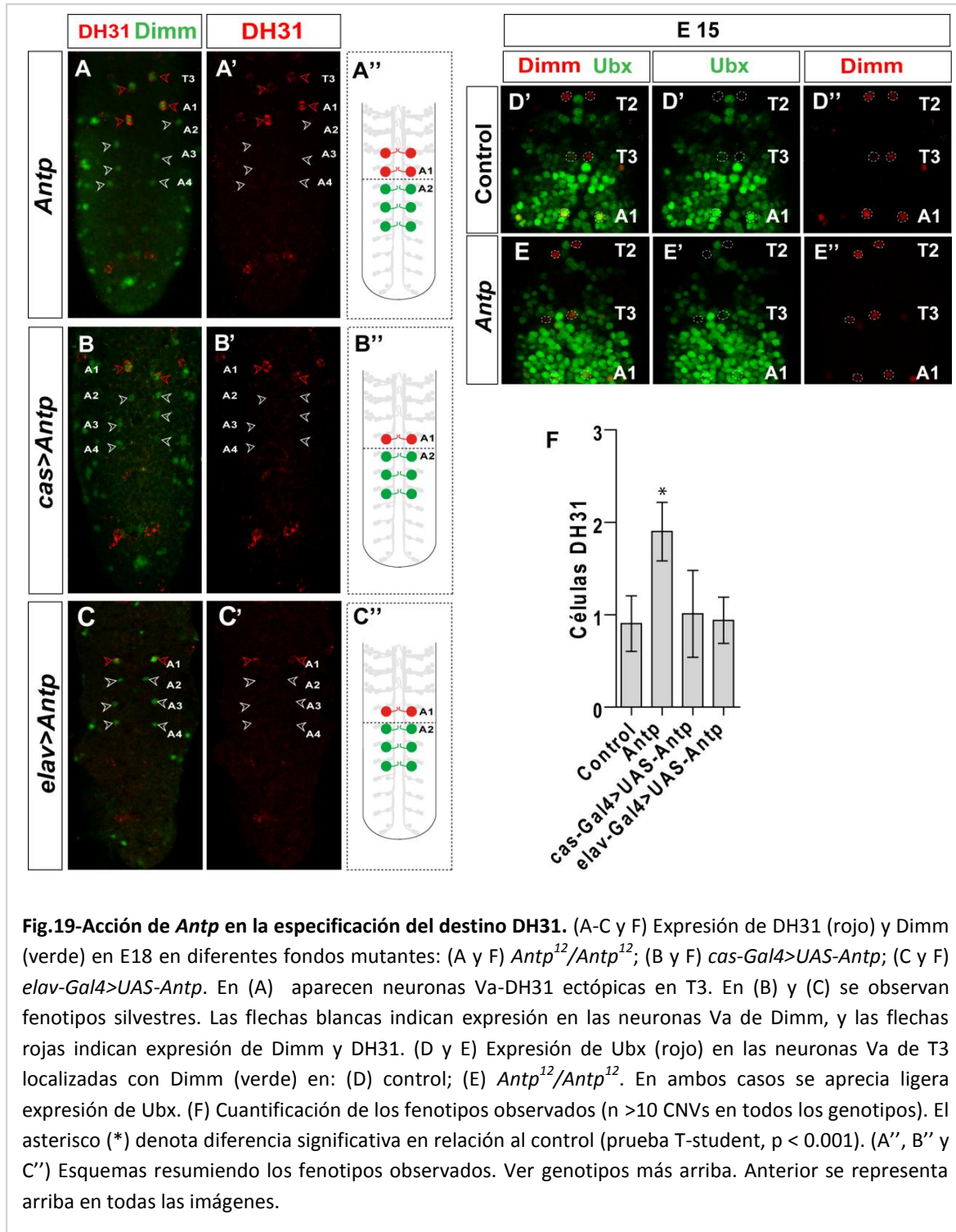
De acuerdo con los resultados expuestos, se concluye que el gen *Ubx* tiene un papel imprescindible, y aparentemente post-mitótico, en la especificación de la neurona Va-A1 como neurona que expresa Dimm, Dac y el neuropéptido DH31. La sobreexpresión de este gen desde los *drivers cas-Gal4* y *elav-Gal4* es suficiente para producir células equivalentes a las Va-DH31 en los segmentos torácicos T2-T3.

3.3 Altos niveles de Antp enmascaran la función de *Ubx* en T3, pero no modifican su expresión.

Teniendo en consideración los altos niveles de expresión de *Antp* presentes en las neuronas Va de los segmentos torácicos en estadio embrionario 15, y dada la ausencia de expresión tanto de Dimm como de Dac (Suska et al., 2011), se trató de determinar si *Antp* desempeñaba un papel supresor, además de sobre la expresión de Dimm y Dac, sobre la adquisición del destino Va-DH31. Podría ocurrir que, en segmentos torácicos, los altos niveles de *Antp* fuesen responsables de la bajada de niveles de Dimm en las neuronas Va recién nacidas, además de impedir la expresión de Dac y DH31.

Se examinó la expresión del neuropéptido DH31 en embriones de estadio 18 mutantes homocigotos para *Antp*. Se observó cómo la expresión de DH31 se expandía también a la neurona Va del segmento T3 (Fig. 19 A y E). Esta neurona, además, expresaba Dac (datos no mostrados), y mantenía la expresión de Dimm más allá del estadio 15, momento en el cual su expresión desaparece en individuos silvestres.

Con el fin de conocer la causa de esta transformación del destino de la neuronas Va-torácicas en neuronas Va-DH31, se examinó la expresión de *Ubx* en las neuronas Va de los segmentos torácicos de embriones control y de mutantes *Antp*, en estadio 15. Se observó que tanto en los individuos control como en los mutantes *Antp*, *Ubx* parecía expresarse en bajos niveles en la neurona Va del segmento T3 (Fig. 19 C y D). Por tanto, el fenotipo observado en mutantes *Antp* no era debido a un aumento en la expresión de *Ubx*. Los bajos niveles de *Ubx* en condiciones silvestres, quedaban enmascarados por los altos niveles de expresión de *Antp* en los segmentos torácicos, pero cuando *Antp* no estaba presente, como ocurre en los mutantes de *Antp*, estos bajos niveles de expresión de *Ubx* eran capaces de producir Dimm, Dac y DH31.



Para testar la posibilidad de que altos niveles de *Antp* pudiesen modificar la acción de *Ubx* en otras neuronas Va, se examinó qué ocurría en las neuronas Va-DH31 del segmento A1 (que en condiciones silvestres expresan Dimm y DH31), cuando se inducían altos niveles de expresión de *Antp*. Se examinó la expresión de DH31 en individuos que sobre-expresaban *Antp*, desde los drivers *cas-Gal4* y *elav-Gal4* (*cas-Gal4*>*UAS Antp*; y *elav-Gal4*>*UAS Antp*). Se observó que la expresión de DH31 no se veía alterada respecto a los del control (Fig. 12 D y E), posiblemente

porque la expresión de Ubx, a diferencia de lo que pasaba en la neurona Va de T3, es muy elevada en A1 (Suska et al., 2011).

En la neurona Va-T3, los altos niveles de Antp bloquean la acción de los bajos niveles de Ubx, pero en ausencia de Antp, como ocurre en mutantes *Antp*, se produce un desenmascaramiento de los bajos niveles de Ubx que causa un cambio de destino en las neuronas Va de T3 (expresan DH31). Sin embargo, la sobreexpresión de Antp no produce ningún efecto sobre la expresión de DH31 en A1, seguramente debido a los altos niveles de Ubx.

3.4 Altos niveles de Antp modifican la función de *abd-A* en las neuronas Va-Capa, pero no modifican su expresión.

Para profundizar en el estudio del papel llevado a cabo por *Antp* en la especificación del destino de las neuronas Va, se quiso comprobar si altos niveles de Antp alteraban la función de *abd-A*, y para ello se estudió el fenotipo producido por la sobre-expresión de *Antp* en las neuronas Va-Capa desde *cas-Gal4* y *elav-Gal4* (*cas-Gal4>UAS Antp*; y *elav-Gal4>UAS Antp*). Los resultados obtenidos mostraron que al sobre-expresarlo desde *cas-Gal4*, a pesar de que las neuronas estaban presentes y expresaban Capa, la intensidad de expresión del neuropéptido se veía reducida con respecto al control (Fig. 20A, B, C y F). Se examinaron los niveles de Abd-A tanto en controles como en situación de sobre-expresión de *Antp*, y se observaron niveles similares en ambos casos (Fig.20D, E y G).

Por tanto, también en este caso la regla de prevalencia posterior se volvía a poner en entredicho, dado que la sobre-expresión de un gen anterior como *Antp* era capaz de modificar, al menos parcialmente, la acción de genes posteriores como *abd-A*. Además, este fenotipo no era consecuencia de una regulación directa entre *Antp* y *abd-A*, puesto que los niveles de Abd-A eran iguales en situaciones control que cuando se sobre-expresaba *Antp*.

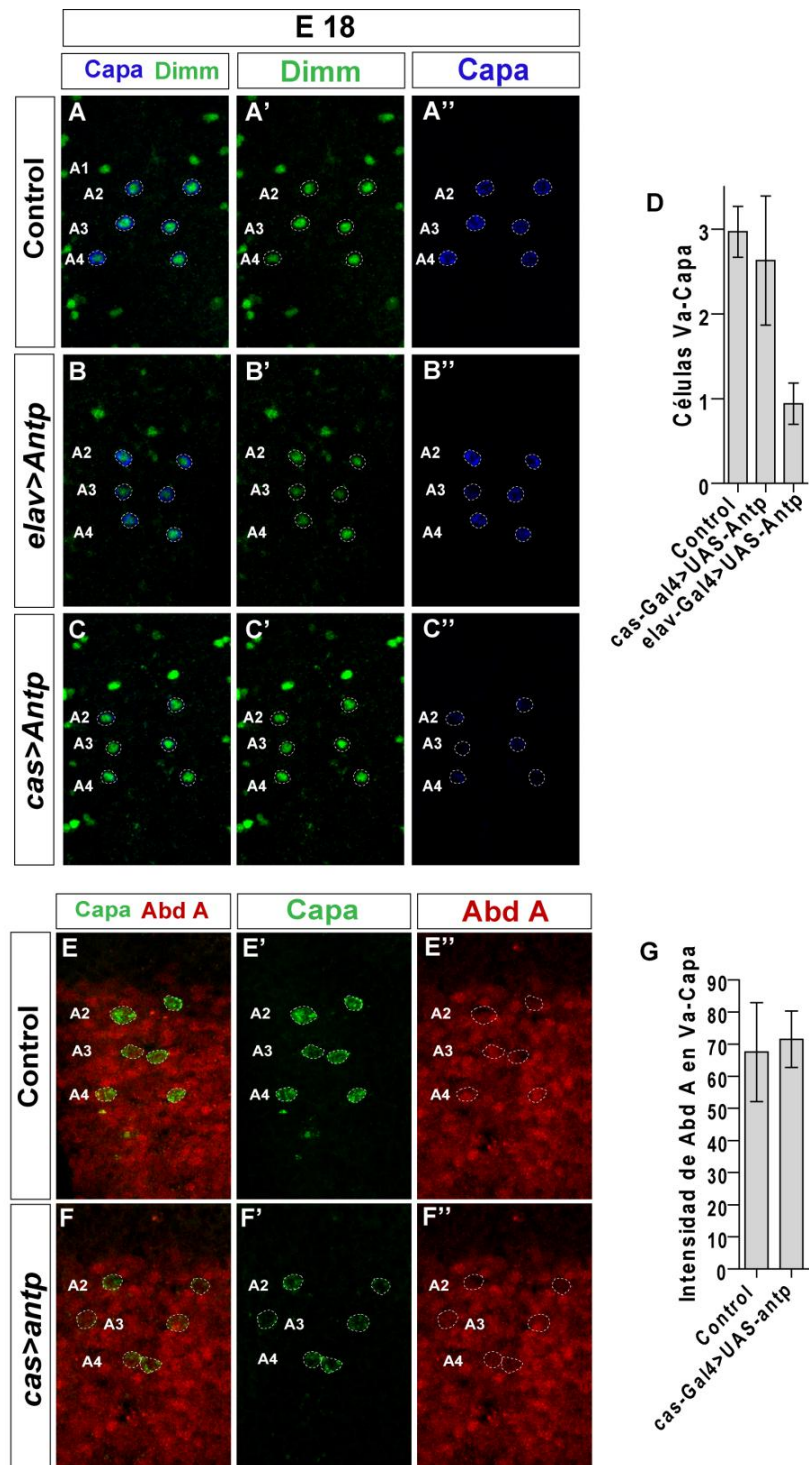


Fig.20- Papel de la sobre-expresión de Antp en la especificación de las neuronas Va-Capa. (A-D) Expresión de Capa (azul) y Dimm (verde) en E18 en diferentes fondos mutantes: (A y D) control; (B y D) *elav-Gal4>UAS-Antp*; (C y D) *cas-Gal4>UAS-Antp*. En (C) la expresión de Capa es menos intensa. (E, F y G) Expresión de Abd-A (rojo) en las neuronas Va-Capa localizadas con Capa (verde) en: (E) control; (F) *cas-Gal4>UAS-Antp*. (D y G) Cuantificación de los fenotipos observados (n >10 CNVs en todos los genotipos). El asterisco (*) denota diferencia significativa en relación al control (prueba T-student, p < 0.001). Ver genotipos más arriba. Anterior se representa arriba en todas las imágenes.

Resulta interesante mencionar que los resultados obtenidos al sobre-expresar *Antp* desde *elav-Gal4* y desde *cas-Gal4* eran diferentes. Este hecho se interpreta porque, como se explica en el apartado 1.3 de “Resultados” y se puede observar en la figura 3, la expresión de *cas-Gal4* en las neuronas Va-Capa es extremadamente alta, a diferencia de lo que ocurre con *elav-Gal4* (datos no mostrados). Este dato junto a los resultados anteriormente expuestos, indican que los niveles en los que se expresan los Hox son determinantes a la hora de definir las relaciones que se establecen entre sus funciones.

La sobre-expresión de *Antp* desde *cas-Gal4* altera parcialmente la función de *abd-A* en las neuronas Va de A2-A4, reduciendo los niveles de expresión de Capa, pero no altera los niveles de expresión de Abd-A. Por tanto, la regulación recíproca entre *Antp* y *abd-A* en el sistema Va, se da a nivel de función, pero no se modifica la expresión de dichos genes.

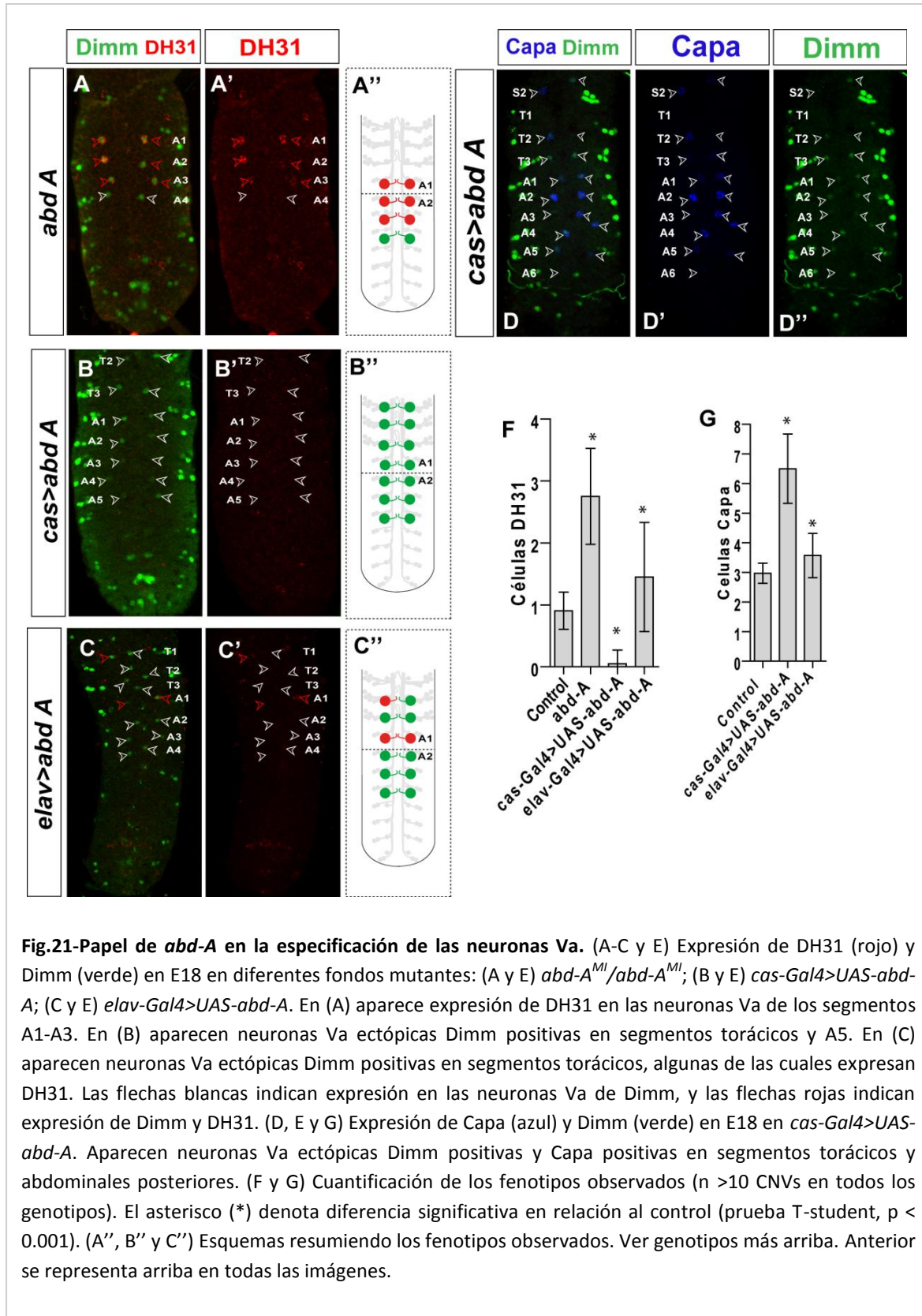
3.5 Altos niveles de expresión de *abd-A* pueden producir especificación del destino Va-Capa tanto en segmentos torácicos, como en los abdominales posteriores

El papel de *abd-A* en la diferenciación de las neuronas Va-Capa fue mostrado por la falta de expresión del neuropéptido Capa en A2-A4 en individuos mutantes homocigotos para el gen, en los que, por otro lado, la expresión de Dimm y de Dac se veía inalterada (Suska et al., 2011). Para determinar si el fenotipo observado podía estar producido por un cambio en la diferenciación post-mitótica, se analizó si las neuronas Va-Capa de los segmentos A2-A4 se transformaban en neuronas de tipo Va-DH31 en un fondo mutante para *abd-A*. Se observó que las neuronas Va de estos segmentos expresaban el neuropéptido DH-31, y se diferenciaban como Va-DH31 cuando Abd-A no está presente (Fig.21 A y F).

De acuerdo con lo publicado por el grupo de S. Thor en 2011 (Suska et al., 2011), la sobreexpresión de *abd-A* desde *elav-Gal4* produce la expansión de Capa al segmento A1, y crea neuronas Va que expresan Dimm y Dac pero no Capa en los segmentos torácicos. Para determinar qué ocurre con DH31 en A1 y en las neuronas torácicas ectópicas, se sobreexpresó *abd-A* desde los drivers *elav-Gal4* y *cas-Gal4*, y en ambos casos se observó que, efectivamente, aparecían células Va, reconocibles por su expresión de Dimm y Dac, en los segmentos T1-T3. (Fig. 21B, C y F). Sin embargo, en lo que respecta a la expresión de DH31, en cada caso se observaban resultados diferentes. Mientras que en la sobre-expresión desde

elav-Gal4 algunas de las neuronas expresaban DH31, al utilizar *cas-Gal4* ninguna de las neuronas torácicas generadas lo hacía (Fig. 21 B, C y F). Para determinar si en este caso esas neuronas torácicas adquirirían el destino de Capa, se examinó la expresión de este neuropéptido en condiciones de sobreexpresión de *abd-A* desde *cas-Gal4*. Los resultados mostraron que, a diferencia de lo que pasaba al utilizar *elav-Gal4*, tanto la neurona de A1 como las neuronas torácicas expresaban Capa. Además, sorprendentemente aparecían neuronas Va-Capa en segmentos posteriores (A5-A7), siendo por tanto una excepción más a la regla de prevalencia posterior (Fig. 21D y G). La diferencia de resultados observada entre ambos *drivers*, se interpretó igual que en el apartado anterior (apartado 3.4 de “Resultados”), por la intensa expresión que genera *cas-Gal4* en las neuronas Va-Capa, a diferencia de lo que ocurre con el *driver elav-Gal4*.

En mutantes *abd-A* las neuronas Va de los segmentos A2-A4 se transforman en Va-DH31, por lo que se deduce que altos niveles de *abd-A* como los presentes en condiciones silvestres en las neuronas Va de A2-A4, inhibe la diferenciación de estas neuronas en Va-DH31. Esta inhibición se produce también al sobre-expresar *abd-A* desde *cas-Gal4*, ya que no se observa expresión de DH31 en la neuronas Va de A1, pero sí de Capa. Sorprendentemente, en este contexto aparecen también neuronas Va-Capa en los segmentos abdominales posteriores, lo que supone una excepción más a la prevalencia posterior. Los resultados obtenidos desde *elav-Gal4* no producen un fenotipo tan fuerte como el observado desde *cas-Gal4*.



Apartado IV de Resultados:

Nuevos genes implicados en el patrón de expresión de Capa.

De entre los resultados del *screening* genético llevado a cabo para identificar genes implicados en el procesos de especificación de las neuronas Va-Capa (Apartado 1.6 de “Resultados”), se decidió profundizar en el estudio de 3 de ellos debido a sus interesantes fenotipos: *scribbler* (*sbb*), *dachshund* (*dac*) y *klumpfuss* (*klu*). Los resultados obtenidos se muestran en los siguientes apartados.

4.1 *scribbler* y *dachshund* son necesarios para la muerte celular programada dependiente de *Abd-B* en las neuronas Va posteriores.

En estadio 16 embrionario, se pueden encontrar una pareja de neuronas Va en cada uno de los segmentos A1-A7 (Suska et al., 2011) y pueden ser localizadas por la co-expresión de Dimm y *Dac*. A final de este estadio, *Abd-B* promueve la muerte por apoptosis de las neuronas Va de los segmentos A5-A7 (Suska et al., 2011), hecho que pudo ser contrastado gracias al estudio de los mutantes *Abd-B*, en los que las neuronas Va-Capa de segmentos posteriores no sufren procesos de muerte celular programada. Además, en consonancia con este resultado, la sobre-expresión de *Abd-B* desde *elav-Gal4* y *Va-Gal4* produce muerte celular en todas las neuronas Va-Capa (Suska et al., 2011; datos no mostrados).

Resulta especialmente interesante que *Abd-B* sea capaz de producir apoptosis en determinados subtipos celulares, mientras que en otros, como es el caso de las neuronas que expresan el péptido ILp7 (“*insulin-like peptide*”) de los segmentos A6-A8, tenga incluso una acción completamente opuesta, previniendo la apoptosis (Miguel-Aliaga y Thor, 2004). Este hecho lleva a pensar que este gen debe actuar en un contexto transcripcional específico, junto a otros factores, para poder inducir procesos de muerte celular programada.

Los principales genes candidatos para formar parte de este grupo de factores eran aquellos cuya mutación causaba la supervivencia de las neuronas Va de los segmentos A5-A7 más allá del estadio 16 en el que normalmente mueren. De esta manera se identificaron dos genes: *scribbler* (*sbb*) y *dachshund* (*dac*).

En mutantes *sbb*, se observó que las neuronas Va del segmento A5 seguían presentes en el estadio embrionario 18, mientras que en los mutantes *dac* no solo las neuronas del segmento A5, sino también de A6, podían localizarse en este estadio (Fig.22A, B, C y F). De igual manera que ocurre en los mutantes *Abd-B* (Suska et al., 2011); o cuando se inhiben los procesos de muerte celular en individuos homocigotos para la deficiencia *H99* (apartado 1.4 de “Resultados”), estas neuronas de los segmentos posteriores adquirirían el destino Va-Capa, y por tanto expresaban Dimm, *Dac* y *Capa* (datos no mostrados).

El estudio de la expresión de estos genes en las neuronas Va reveló que mientras que la expresión de *Abd-B* se producía exclusivamente en las neuronas que iban a sufrir procesos de muerte celular (Suska et al., 2011), es decir, en A5-A8, la expresión tanto de *sbb* como de *Dac* se extendía a todas las neuronas Va (Fig.22G; Fig.14 ; Fig.15 A,C y D). Por tanto, *Abd-B* parecía ser necesario y suficiente para producir la MCP, mientras que *sbb* y *dac* eran necesarios pero no son suficientes. Este hecho fue contrastado por los experimentos de sobre-expresión tanto de *sbb* como de *dac* (*elav-Gal4>UAS-sbb* y *elav-Gal4>UAS-dac*), en los que no se observó ningún fenotipo en las neuronas Va-Capa (Fig.22D, E y F).

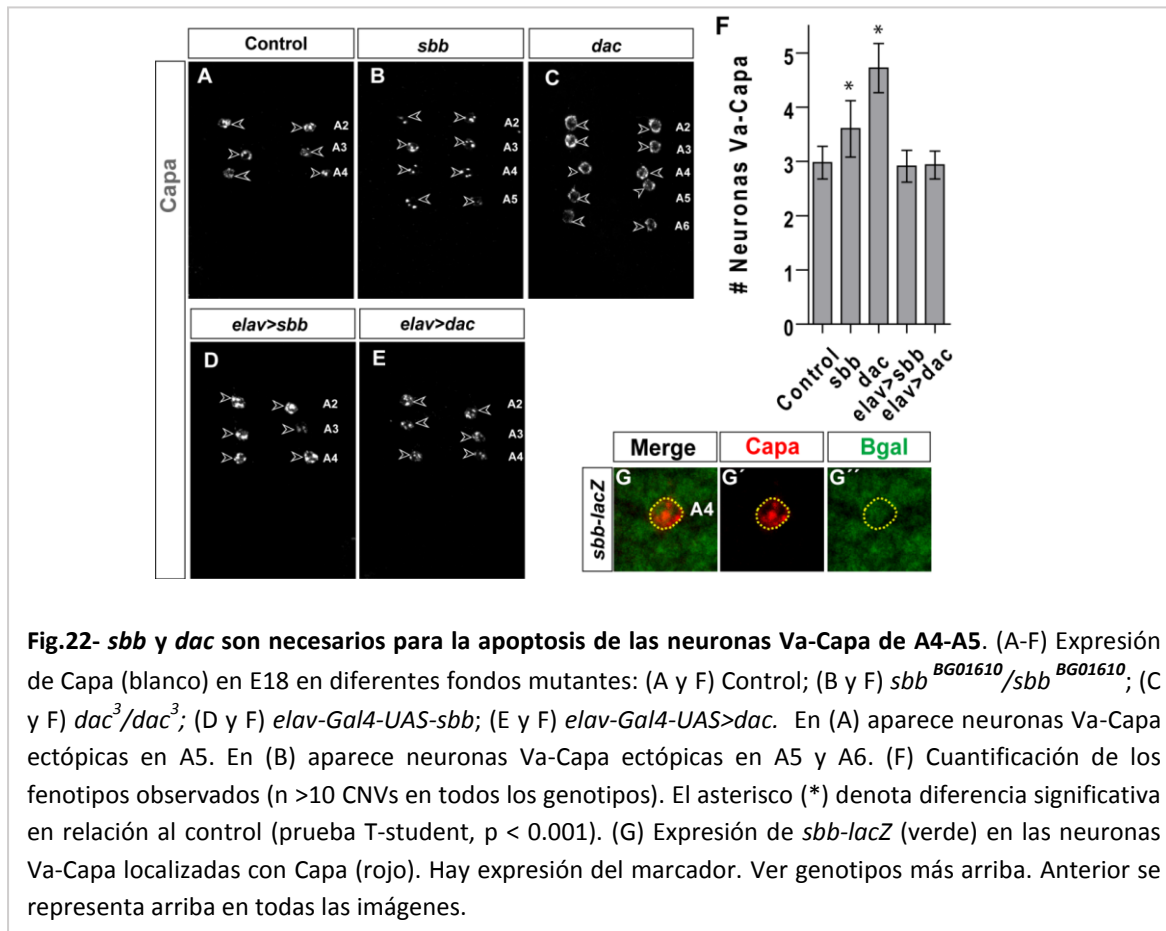
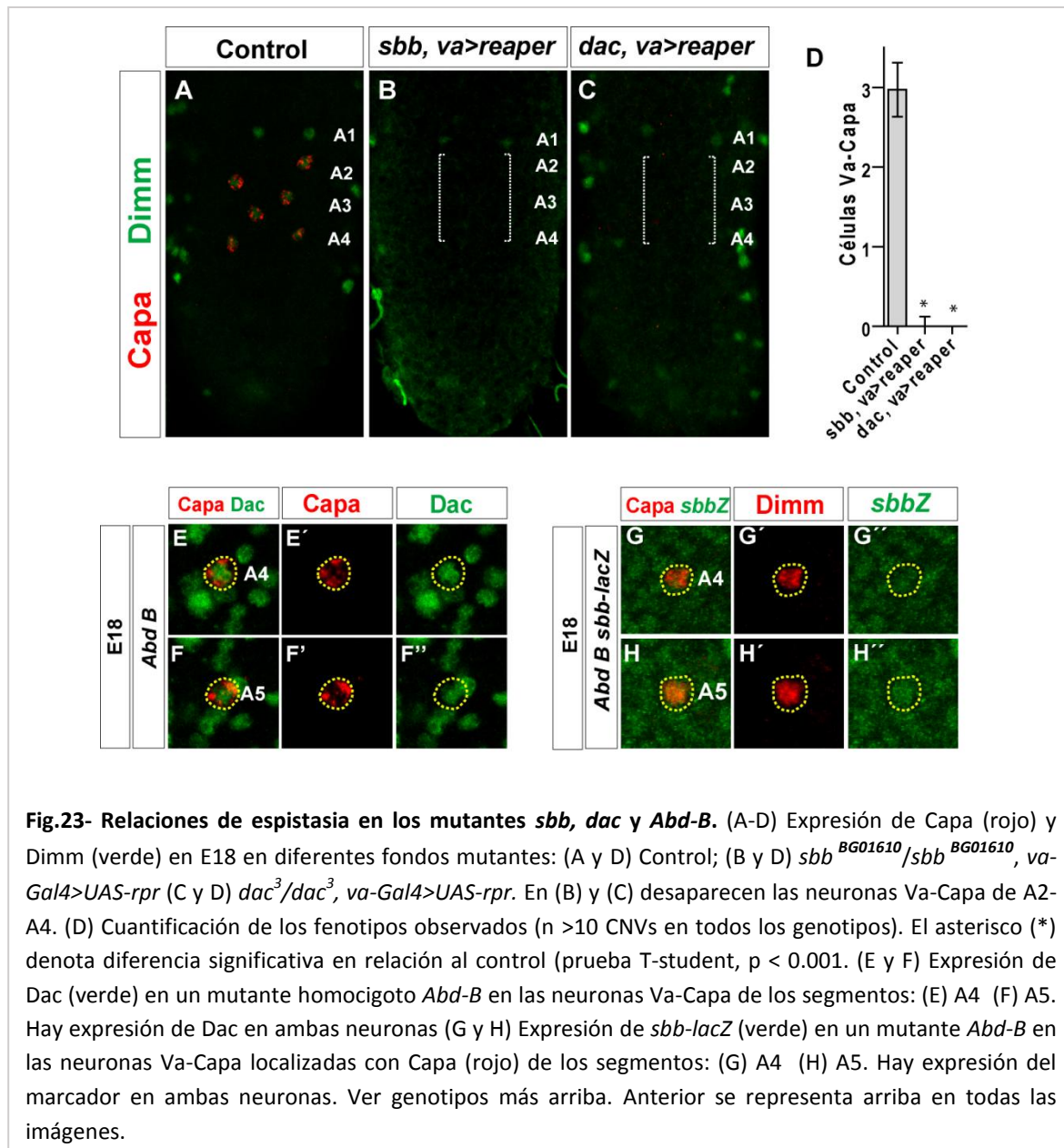


Fig.22- *sbb* y *dac* son necesarios para la apoptosis de las neuronas Va-Capa de A4-A5. (A-F) Expresión de *Capa* (blanco) en E18 en diferentes fondos mutantes: (A y F) Control; (B y F) *sbb*^{BG01610}/*sbb*^{BG01610}; (C y F) *dac*³/*dac*³; (D y F) *elav-Gal4-UAS-sbb*; (E y F) *elav-Gal4-UAS>dac*. En (A) aparece neuronas Va-Capa ectópicas en A5. En (B) aparece neuronas Va-Capa ectópicas en A5 y A6. (F) Cuantificación de los fenotipos observados (n >10 CNVs en todos los genotipos). El asterisco (*) denota diferencia significativa en relación al control (prueba T-student, p < 0.001). (G) Expresión de *sbb-lacZ* (verde) en las neuronas Va-Capa localizadas con *Capa* (rojo). Hay expresión del marcador. Ver genotipos más arriba. Anterior se representa arriba en todas las imágenes.

Para poder conocer en más detalle el papel desempeñado por estos genes en el desarrollo de las neuronas Va posteriores, se examinaron las diferentes relaciones de epistasia establecidas entre estos factores y otros conocidos implicados en procesos de MCP. En primer lugar, se estudió si la expresión postmitótica del gen pro-apoptótico *reaper* en todas las neuronas Va, era suficiente para causar su muerte celular incluso en individuos mutantes para *dac* y para *sbb* (*dac/dac*, *Va-Gal4>UAS-rpr* y *sbb/sbb*, *Va-Gal4>UAS-rpr*) (Fig.23 A, B, C y D). En estos individuos, se observó que todas las neuronas Va morían, por lo que se dedujo que la acción tanto de *dac* como de *sbb* era jerárquicamente anterior a la activación de los genes apoptóticos RHG.



En segundo lugar, se estudió si Abd-B era esencial para la correcta expresión de *sbb* y *dac*. Para ello se analizó en mutantes *Abd-B* la expresión de *sbb-lacZ* y *Dac*, tanto en las neuronas Va de los segmentos A2-A4, como las neuronas ectópicas de los segmentos A5-A7. Se observó que ambos genes se podían expresar con normalidad incluso en ausencia de Abd-B, lo que indicaba que *Abd-B* no era necesario para la expresión de *dac* y *sbb* (*Abd-B* no actúa *upstream* de *dac* y *sbb*) (Fig.23, E, F G y H).

Por último, se examinó si tanto *dac* como *sbb* eran factores necesarios para la correcta expresión de *Abd-B*. Para ello se evaluó si Abd-B se encontraba presente en las neuronas Va extra generadas en los segmentos A5 de los mutantes *sbb*, y en los segmentos A5-A6 de los mutantes *dac* en embriones de estadio 18. Se observó que Abd-B estaba presente en las neuronas de dichos segmentos, pero que no era capaz de producir apoptosis como sí ocurría en condiciones silvestres (Fig 24E y F). Se quiso estudiar el efecto que podía tener el aumento de los niveles de Abd-B en esas neuronas, para lo que se expresó el *UAS-Abd-B* desde *elav-Gal4* en embriones mutantes para *sbb* y embriones mutantes para *dac*. Se observó que en ambos casos, al producir altos niveles de Abd-B en las neuronas Va ectópicas, la apoptosis ocurría con normalidad, y estas neuronas no sobrevivían hasta estadio embrionario 18 (Fig.24 A, B, C y D).

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente expuestos, *scribbler* y *dachsund* son genes expresados en todas las neuronas Va, pero implicados exclusivamente en los procesos de muerte celular mediada por Abd-B que sufren las neuronas de los segmentos A5 y A6. Su expresión no es dependiente de la acción de *Abd-B*, sino que por el contrario, tanto *sbb* como *dac* parecen imprescindibles para alcanzar los niveles de Abd-B necesarios para iniciar los procesos de muerte celular programada en estas neuronas.

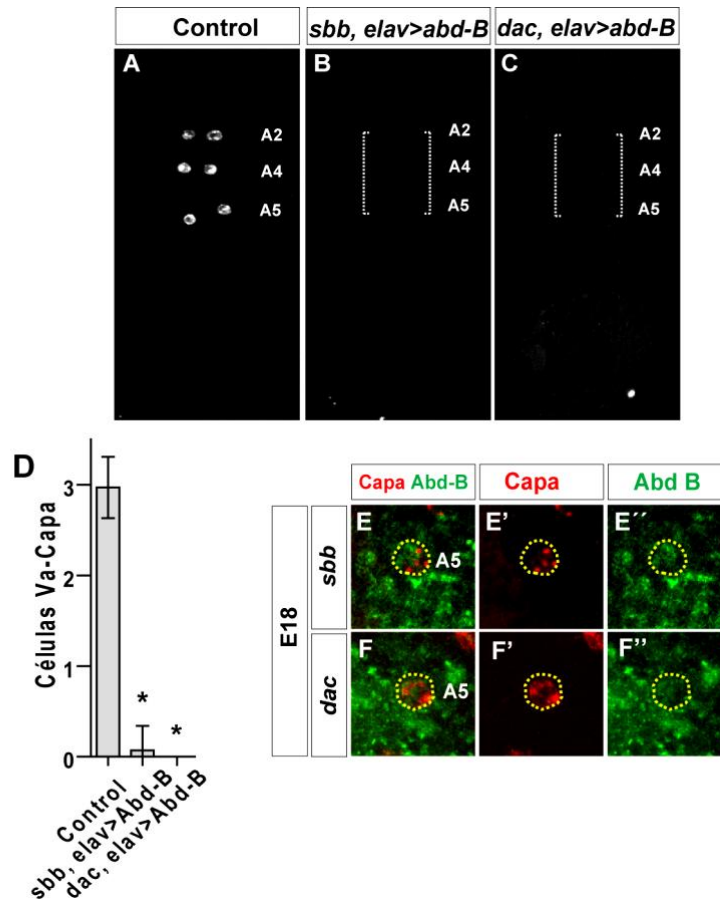


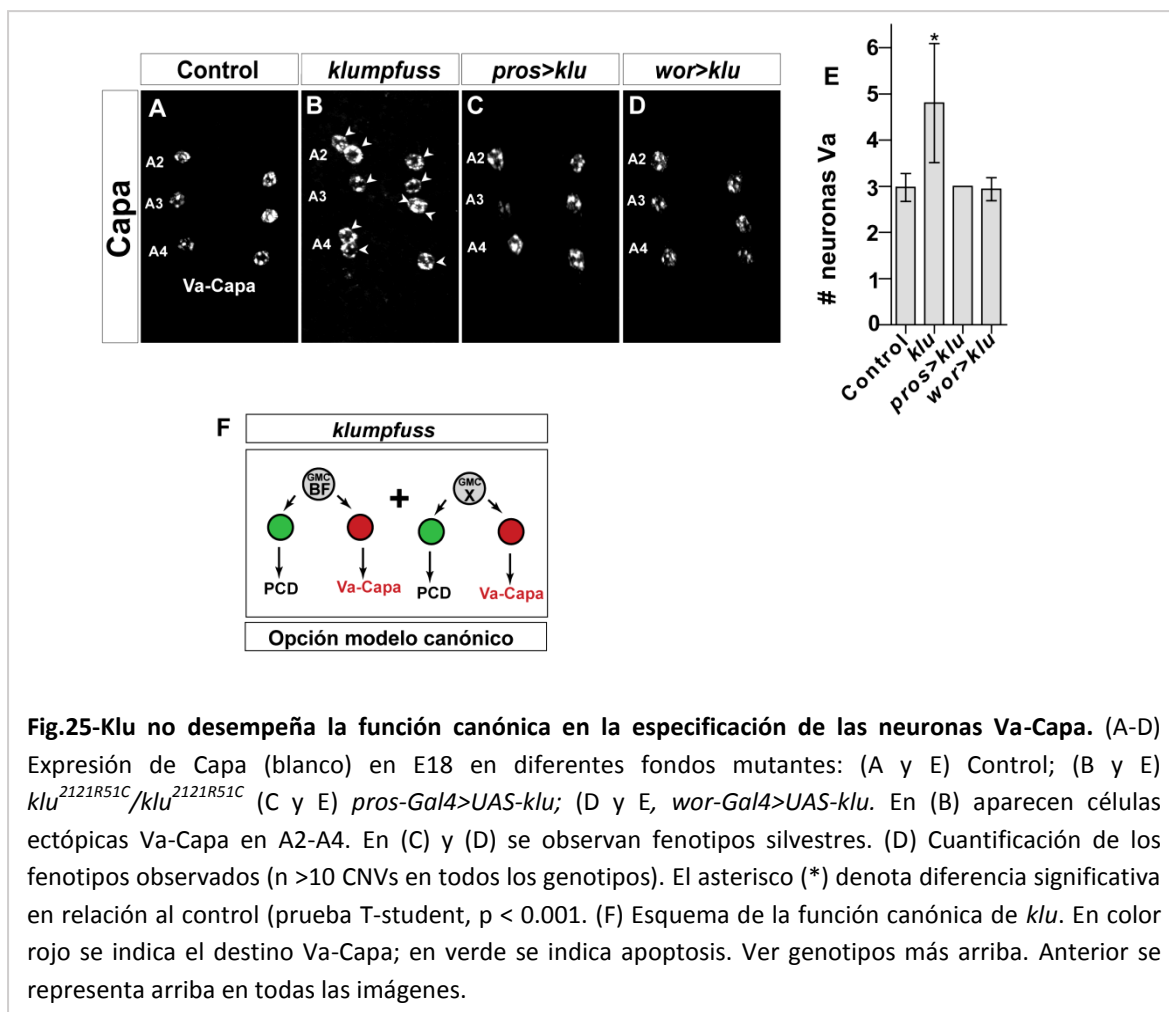
Fig.24-Abd-B y los mutantes *sbb* y *dac* en las neuronas Va-Capa. (A-D) Expresión de Capa (blanco) en E18 en diferentes fondos mutantes: (A y D) Control; (B y D) *sbb*^{BG01610}/*sbb*^{BG01610}, *elav-Gal4>UAS-Abd-B* (C y D) *dac*³/*dac*³, *elav-Gal4>UAS-Abd-B*. En (B) y (C) desaparecen las neuronas Va-Capa. (D) Cuantificación de los fenotipos observados (n >10 CNVs en todos los genotipos). El asterisco (*) denota diferencia significativa en relación al control (prueba T-student, p < 0.001). (E y F) Expresión de Abd-B (verde) en las neuronas Va-Capa localizadas con Capa (roja) de los segmentos A5 en diferentes fondos mutantes: (E) *sbb*^{BG01610}/*sbb*^{BG01610}; (F) *dac*³/*dac*³. Hay expresión de Abd-B en ambas neuronas. Ver genotipos más arriba. Anterior se representa arriba en todas las imágenes.

4.2 Klumpfuss desempeña un nuevo papel en el proceso de especificación de Capa.

Otro de los genes seleccionados a partir del *screening* realizado, cuyo fenotipo de falta de función resultó más interesante, fue *klumpfuss* (*klu*). En los mutantes homocigóticos para este gen se apreciaba un aumento del número de neuronas Va-Capa, que se localizaban en los segmentos A2-A4 muy cerca de las neuronas Va-Capa originales, formando parejas de células (Fig. 25 A, B y E). Este fenotipo parecía consistente con el papel de *klu* anteriormente descrito en el NB 4-2 (modelo canónico; Yang et al., 1997) en el que resulta indispensable para

diferenciar el destino adquirido por dos CMG: su acción impide que la CMG2 adopte el destino de la CMG1. De cumplirse el modelo canónico en el sistema Va, *klu* actuaría en una CMG antecesora o predecesora a la CMG que genera la neurona Va original, y en ella reprimiría la formación de Va-Capa. Por tanto, en mutantes *klu* ambas CMG generarían una neurona Va-Capa (Esquema Fig. 25 F). Para estudiar esta posibilidad, se expresó *UAS-klu* desde *prospero-Gal4*, *driver* específicamente expresado en CMG. De acuerdo con el modelo canónico de actuación, en esta situación *klu* reprimiría la formación de Va-Capa en todas las CMG y por tanto no se esperaría encontrar ninguna neurona Va-Capa. Sorprendentemente se observó que el número de neuronas que expresaba Capa se veía inalterado (Fig. 25C y E). Se observó el mismo resultado haciendo uso del *driver worniu-Gal4*, que dirige la expresión específicamente al NB (Fig. 25 D y E).

Resumiendo los resultados presentes en este apartado, el modelo de actuación canónico de *klu* no explica satisfactoriamente los resultados de sobre-expresión de *klu* en el sistema de neuronas Va, y por tanto, se deduce que desempeña un nuevo rol en el linaje del NB 5-3.



4.3 *klumpfuss* es necesario, pero no suficiente, para producir la muerte celular programada de la neuronas hermanas de las Va-Capa

Como fue anteriormente explicado en el apartado 1.4 de “Resultados”, las neuronas hermanas de las Va-Capa, es decir las originadas por la misma CMG, mueren por apoptosis en estadios muy tempranos. Para comprobar si las neuronas Va-Capa extra generadas en mutantes *klu* pudieran ser las neuronas hermanas que no sufrían apoptosis, o si eran por el contrario neuronas originadas a partir de otro NB o CMG, (resumen Fig.26 B), se generó un doble mutante *klu* y *Df(3L)H99* (*H99*). Los embriones homocigotos para *H99* presentan una falta aparentemente total de apoptosis, por lo que si las neuronas Va-Capa extra no eran las neuronas hermanas, en el doble mutante *klu-H99* deberían aparecer nuevas neuronas extra correspondientes a las hermanas de Va-Capa. En este caso, en cada hemisegmento se deberían observar cuatro neuronas Capa: dos correspondientes a la neurona Va-Capa y a su hermana, y dos generadas de una nueva manera desconocida. Los resultados obtenidos indicaron que, en los individuos homocigotos para el doble mutante, solo se originan 2 neuronas Va-Capa por hemisegmento (Fig.26 A, C y F). Este hecho evidenció que se trata de las neuronas hermanas, y que por consiguiente, *klu* desempeña su papel en los procesos de muerte celular sufridos por dichas neuronas en condiciones normales. Además, como era esperable, se observaban parejas de neuronas Va-Capa en los segmentos A5-A7, imitando el fenotipo de los individuos *H99* (apartado 1.4 de “Resultados”).

Con el fin de conocer si *klu* era suficiente para producir la muerte de las neuronas Va-Capa originales, se expresó *UAS-klu* desde *elav-Gal4*, que es expresado de manera post-mitótica en todas las neuronas. Los resultados obtenidos indicaron que *klu* no es suficiente para producir la muerte celular programada de las neuronas Va (Fig.26 D y F). Se obtuvo el mismo resultado utilizando el *driver Capa-Gal4* (*Va-Gal4*) (Fig.26 E y F).

Se concluye por tanto que, en condiciones normales, *klu* es necesario, pero no suficiente, para la muerte celular programada de las neuronas hermanas de Va-Capa.

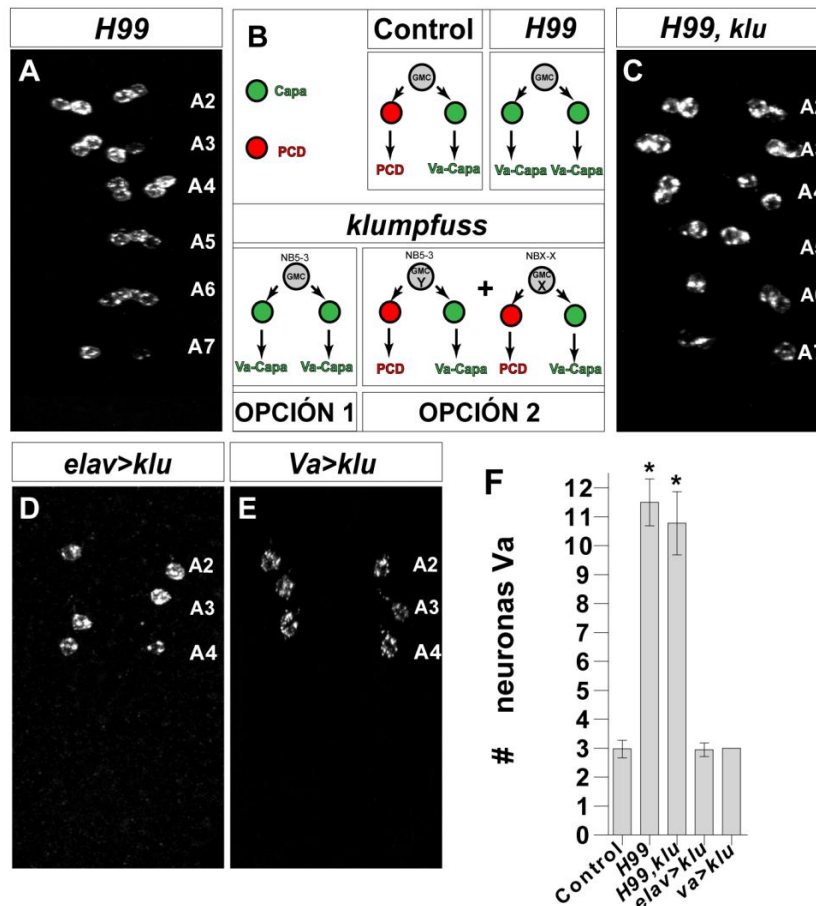


Fig.26- *klumpfuss* es necesario para producir apoptosis en las neuronas hermanas Va-Capa. A, C, D, E y F) Expresión de Capa (blanco) en E18 en diferentes fondos mutantes: (A y F) *DfH99-klu/DfH99-klu* (C y F) *DfH99/DfH99*. (D y F) *elav-Gal4>UAS-klu*; (E y F) *va-Gal4>UAS-klu*. (F) Cuantificación de los fenotipos observados (n > 10 CNVs en todos los genotipos). El asterisco (*) denota diferencia significativa en relación al control (prueba T-student, p < 0.001). (B) Esquema resumiendo la creación de la neurona Va-Capa y de su hermana a partir de la CMG en condiciones control; en *DfH99/DfH99*; y en *klu/klu*. Según la opción 1 las neuronas ectópicas creadas en mutantes *klu* corresponden a las neuronas hermanas. Según la Opción 2 (Canónica) las neuronas ectópicas creadas en mutantes *klu* corresponden a otras neuronas creadas a partir de una CMG diferente. En color rojo se indica el destino Va-Capa; en verde se indica apoptosis. Ver genotipos más arriba. Anterior se representa arriba en todas las imágenes.

4.4 *klumpfuss* parece ejercer su función en la CMG progenitora de las neuronas Va-Capa.

Con el fin de conocer en qué momento y en qué lugar desempeñaba *klu* su función, se analizó la expresión de la proteína Klu en las neuronas Va-Capa. Para ello se hizo uso del anticuerpo anti Klu. Dado que las neuronas Va pueden ser localizadas en estadios tempranos mediante la co-localización de los marcadores Dimm y Dac, y su posición ventral, se estudió la expresión de

la proteína Klu en estadio 15. A pesar de que la expresión de Klu es abundante en este estadio (en otras regiones del SNC), no se detectó esta proteína en las neuronas Va (Fig. 27 B). Se analizó también la expresión de la construcción reportera *klu-lacZ* dentro de las neuronas Va-Capa, y en este caso se pudo encontrar señal de B-Galactosidasa incluso en estadio embrionario 18 (Fig.27 A). Estos resultados indicaban que Klu y *klu-lacZ* eran expresados o bien por las neuronas Va recién nacidas (antes incluso del estadio 15) y/o por la CMG progenitora. La diferencia de expresión observada entre la proteína Klu y la construcción *lacZ* puede ser explicada debido a la diferente vida media de estas proteínas: mientras que Klu desaparece de las neuronas Va antes de que sean localizadas por la co-expresión de Dimm y de Dac (estadio embrionario 15), la proteína B-gal, cuya vida media es mayor que la de la proteína Klu endógena, persiste en la neurona post-mitótica incluso tras heredarse desde la CMG progenitora.

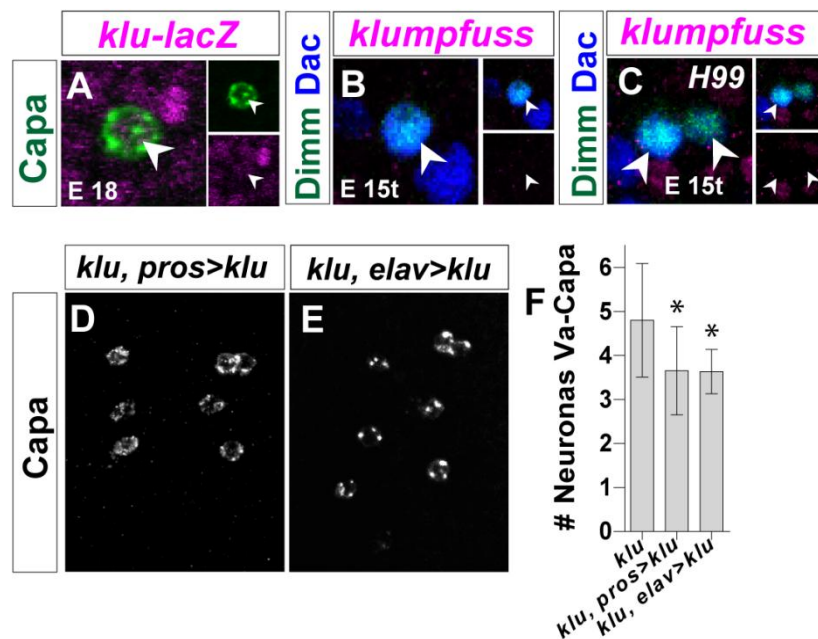


Fig.27- *klumpfuss* parece ejercer su función en la CMG y/o neurona recién nacida. (A) Expresión de *klu-lacZ* (magenta) en E18 en las neuronas Va-Capa localizadas con Capa (verde). La neurona expresa el marcador. (B y C) Expresión de Klu (magenta) en E15 en las neuronas Va-Capa localizadas con Dimm (verde) y Dac (azul) en diferentes fondos mutantes: (B) Control; (C) *DfH99/DfH99*. Ninguna de las neuronas expresa Klu. (D, E y F) Expresión de Capa (blanco) en E18 en diferentes fondos mutantes: (D y F) *klu^{2121R51C}/klu^{2121R51C}, pros-Gal4>UAS-klu*; (E y F) *klu^{2121R51C}/klu^{2121R51C}, elav-Gal4>UAS-klu*. (F) Cuantificación de los fenotipos observados (n >10 CNVs en todos los genotipos). El asterisco (*) denota diferencia significativa en relación al control (prueba T-student, p < 0.001. Ver genotipos más arriba. Anterior se representa arriba en todas las imágenes.

Posteriormente, para descartar que *klu* ejerciera su función en la neurona hermana de Va-Capa, y que por eso no se observase expresión de Klu en la neurona Va-Capa original, se estudió su expresión en un mutante *H99*. En estos individuos la apoptosis se ve inhibida, y por tanto, las neuronas hermanas sobreviven y puede ser localizadas. La expresión de Klu, tanto en las neuronas Va originales como en las hermanas, resultó también negativa (Fig.20C), hecho compatible con la hipótesis de que la expresión de Klu tuviese lugar en la CMG.

Para obtener información adicional en este sentido, se trató de rescatar la expresión silvestre de Capa en los mutantes *klu*, expresando *UAS-klu* desde diferentes *drivers* que dirigen la expresión a CMG (*prospero-Gal4*) y a neurona post-mitótica (*elav-Gal4*). En ambos casos se observó un importante rescate del fenotipo (Fig. 27 D, E y F).

La ausencia de expresión post-mitótica tardía de la proteína, tanto en la neurona original como en su hermana, junto a la expresión de *klu-lacZ*, sugieren que *klu* desempeña su papel en la CMG o en la neurona recién nacida. Este hecho se ve respaldado por los rescates obtenidos al expresar *UAS-klu* desde *elav-Gal4* y *pros-Gal4*

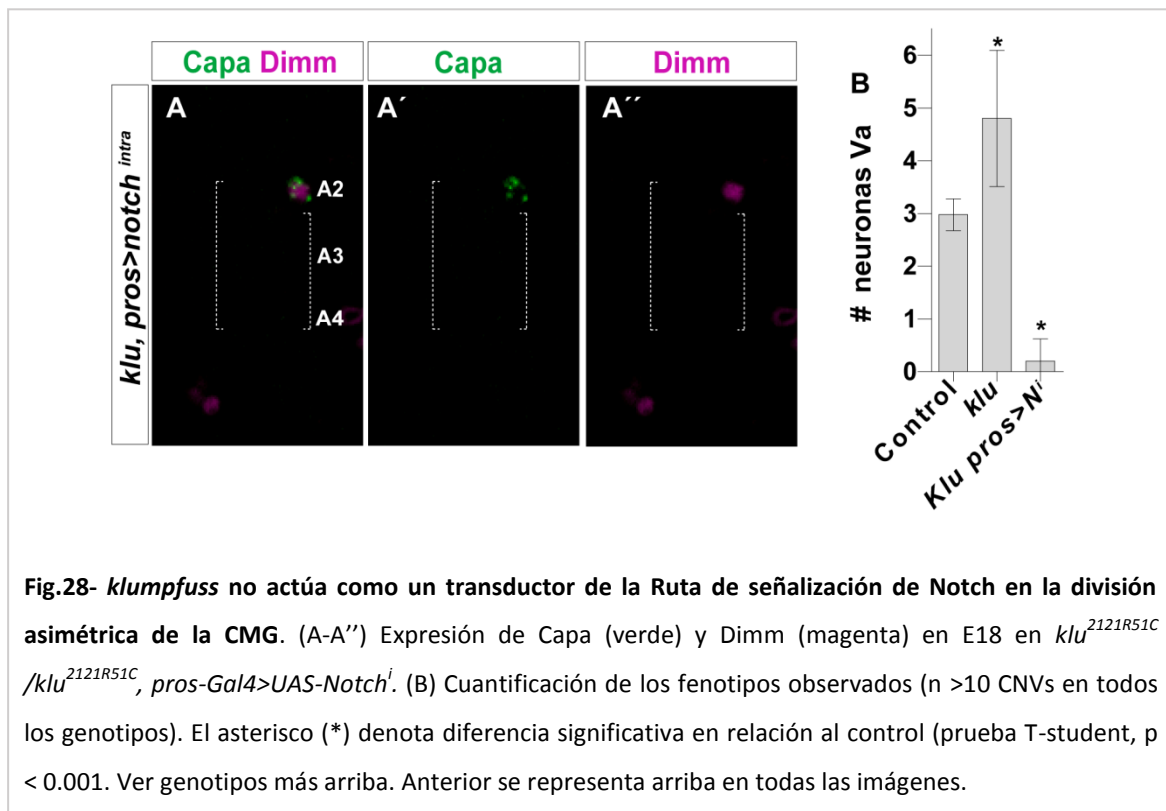
4.5 *klu* no actúa como un transductor de la Ruta de señalización de Notch en la división asimétrica de la CMG.

La activación diferencial de la ruta de Notch es uno de los hecho fundamentales en los procesos de división asimétrica sufridos por las CMG (Doe y Bowerman, 2001; Fuerstenberg et al., 1998; Spana y Doe, 1996). La inhibición de la señalización de Notch produce un destino “Notch OFF” o destino “B”. Por el contrario, la actuación de Notch provoca que la neurona adquiera el destino “Notch ON” o destino “A” (Cau y Blader, 2009). Este sistema binario permite a las neuronas hermanas adquirir destinos diferentes, e incluso frecuentemente interviene en la decisión entre supervivencia o muerte celular (Lundell et al., 2003). En este sentido, se han descrito casos en ambas direcciones: la señalización de Notch puede inducir supervivencia de la célula y, por tanto, la especificación de un destino neural concreto, pero puede por el contrario producir apoptosis en un sistema celular diferente.

Como se explica en el apartado 1.5 de “Resultados” la ruta de señalización de Notch también cumple un papel esencial en la especificación del destino Va-Capa. En estas neuronas, la ausencia de señalización Notch evita que la célula sufra apoptosis. Es por esto que una

simulación de la activación de la ruta de Notch resulta en una ausencia total de neuronas Va-Capa (apartado 1.5 de “Resultados”).

Dado que en los mutantes *klu* se observa un fenotipo similar al observado en falta de activación de la ruta de Notch, se estudió la posibilidad de que *klu* actuase como ejecutor de la ruta de Notch. Con este objetivo se estudió el fenotipo observado cuando se fuerza la activación de la ruta de Notch en un mutante *klu*. Si *klu* actuase *downstream* de Noth, en estos mutantes, a pesar de que la ruta de Notch se encontrase activa, la ausencia de *klu* impediría la apoptosis, y por tanto, se observarían parejas de neuronas Va-Capa. Sin embargo, los resultados mostraron una ausencia casi total de neuronas Va-Capa en estos individuos (Fig. 20A y B). Para comprobar si estas neuronas estaban o no presentes a pesar de no expresar Capa, se realizó una tinción doble contra Dimm y Dac, y se observó que las neuronas no sobreviven en estos individuos Fig. 28A y B).



Se deduce por tanto, que cuando se fuerza la activación de la ruta Notch en las neuronas Va, *klu* no es imprescindible para producir la muerte celular de estas neuronas. *Klu* actúa o upstream o en paralelo de la ruta de Notch.

DISCUSIÓN

Durante las últimas dos décadas, el esfuerzo de muchos laboratorios se ha centrado en tratar de conocer los mecanismos genéticos y moleculares por los cuales se genera la diversidad neural presente en el Sistema Nervioso Central (SNC) de *Drosophila melanogaster*. Los avances llevados a cabo en este campo son numerosos, y conforman el cimiento básico sobre el que estriba la neurobiología del desarrollo de vertebrados. Sin embargo, existen aún importantes preguntas sin resolver, principalmente por la falta de modelos neurales lo suficientemente sencillos y bien caracterizados para permitir el estudio en profundidad de estos mecanismos. Son pocos los ejemplos de neuronas o células de la glía de las que se conoce su NB progenitor y/o los genes temporales implicados en su especificación. En esta tesis doctoral se caracteriza el linaje de las neuronas Va en la Cuerda Nerviosa Ventral (CNV) con el objetivo de crear un nuevo escenario de estudio para los diferentes mecanismos involucrados en el proceso. Además, el descubrimiento de 4 destinos neurales diferentes (2 de ellos peptidérgicos, como son la expresión del neuropéptido Capa y de la Hormona Diurética-31), dentro de un mismo grupo de neuronas homólogas segmentales, convierten a las neuronas Va en una herramienta muy poderosa para el estudio de la regulación segmental dirigida por los genes Hox y el papel de la muerte celular programada (MCP), permitiendo llegar a un asombroso nivel de detalle. Por otro lado, el *screening* genético llevado a cabo, proporcionó un gran número de genes que han resultado estar implicados en la adquisición de destino de las neuronas Va-Capa. Es el caso de *scribbler (sbb)*, *dachshund (dac)* y *klumpfuss (klu)*, todos ellos relacionados con la MCP en distintos puntos del desarrollo, y con su papel en la concreción del patrón de expresión del neuropéptido Capa.

1. Las células Va son generadas a partir del NB 5-3, en una ventana temporal Cas.

La mayoría, si no todas, de las cerca de 400 células que forman cada hemisegmento son únicas (Landgraf et al., 1997). Los mecanismos por los cuales se genera esta identidad única tienen lugar en el NB, en la CMG y en la neurona o célula de la glía. Por tanto, para un completo entendimiento de las redes regulatorias que especifican un destino determinado, es imprescindible la caracterización del NB y la CMG progenitores. Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que el NB 5-3 es el progenitor de las neuronas Va. Esta conclusión se basa por un lado en la expresión de *gsb-lacZ*, *wg-lacZ*, y *unpg-lacZ*, y la ausencia de expresión *lbe(K)* y *hkb-lacZ* en las neuronas Va-Capa. Por otro lado, la expresión de los mismos

marcadores (*gsb-lacZ*, *wg-lacZ*, y *unpg-lacZ*) se observa en las neuronas Va-DH31. Además, todas las neuronas Va de todos los segmentos expresan *gsb-lacZ*, y su posición dentro de la zona de expresión de este marcador es idéntica en cada segmento. Sin embargo, aunque se sabe que la expresión de *gsb-lacZ* se mantiene específicamente en todas las células de los linajes de los NBs de las filas 5 y 6 (Buenzow y Holmgren, 1995), se desconoce si la expresión del resto de marcadores de NBs descritos en estadio embrionario 11, cambia en la progenie más tardía. Con este insalvable margen de duda, la combinación específica de marcadores de NB encontrados en las neuronas Va-Capa y la posición relativa en el hemineurómero sugieren fuertemente que se originan a partir del NB 5-3. Estudios previos sobre el linaje que origina este NB, mostraron que su descendencia está compuesta por 9-15 células (Bossing et al., 1996). Además, trabajos en los que la MCP fue bloqueada mostraron que el NB 5-3 podía potencialmente producir un linaje mayor, de entre 19 y 27 células, lo que sugiere que podría generar 13 o 14 CMG. La falta de un marcador específico para marcar el linaje del NB 5-3 impidió conocer todos los detalles del mismo, y por tanto determinar el orden de nacimiento de las neuronas Va.

Descubrimientos recientes sobre el NB 5-5 y el NB 5-6 han demostrado que *cas* y *grh* actúan de manera conjunta como genes temporales para especificar destinos peptidérgicos al final de los linajes de estos NBs (Baumgardt et al., 2009; Benito-Sipos et al., 2010). De acuerdo a los resultados obtenidos, las neuronas Va (Capa y DH31) no aparecen en mutantes *cas*, y *Cas* se expresa en estas células. Sin embargo, se pueden desarrollar con normalidad en ausencia de *grh* y no expresan *Grh*. Estos datos evidencian que el nacimiento de las neuronas Va se produce en una ventana temporal exclusiva de *cas*.

2. El papel de la muerte celular programada en la determinación del patrón de expresión de las neuronas Va.

La Muerte Celular Programada (MCP) es un proceso básico del desarrollo, y resulta fundamental también en la correcta especificación de las neuronas Va, en la que tiene especial relevancia en dos procesos:

En primer lugar, los resultados mostrados indican que en los segmentos A2-A7, tanto las neuronas Va como sus hermanas, son células equivalentes capaces de expresar el neuropéptido Capa. En anteriores trabajos se han descrito ejemplos en los que la CMG

produce una neurona peptidérgica y su hermana sufre MCP antes de expresar el Np (Benito-Sipos et al., 2010). Los resultados mostrados en esta tesis demuestran que las neuronas hermanas de Va-Capa mueren en condiciones normales en un proceso en el que además, se ha descubierto que interviene *klu* (ver apartados 8 y 9 de “Discusión”). Estas neuronas pueden llegar a expresar Capa si la MCP se encuentra inhibida o si *Klu* está ausente.

En segundo lugar, MCP juega un papel fundamental a la hora de concretar el patrón de expresión de las neuronas Va que expresan Capa, ya que en los segmentos A5-A7 estas neuronas sufren apoptosis justo al empezar a expresar Capa. En situaciones en las que la MCP se ve bloqueada, la CMG da lugar a dos neuronas Va-Capa en los hemisegmentos de A5-A7, que sobreviven, al menos, hasta estadio larvario III. Esta MCP específica de segmento es dependiente de la acción del gen Hox *Abd-B*, que resulta necesario y suficiente para provocar el proceso (Suska et al., 2011). Incluso nuestros estudios demuestran que *Abd-B* puede causar la muerte de manera postmitótica tardía (*Va-Gal4>AbdB*; datos no mostrados). Trabajos previos habían demostrado la implicación de *Abd-B* en procesos de MCP específica de segmento, pero en esos casos la acción de este gen era completamente opuesta, dado que su expresión en la neurona evitaba su apoptosis (Miguel-Aliaga y Thor, 2004).

Asimismo, los resultados demuestran que el momento en el que se lleva a cabo la MCP de las neuronas hermanas es diferente a la que ocurre la MCP de las neuronas Va de los segmentos A5-A7. Las neuronas Va de los segmentos A5-A7 aún pueden ser localizadas en estadio 15 por su co-expresión de *Dimm* y *Dac*, e incluso inician una leve expresión de Capa, a diferencia de lo que ocurre con las neuronas Va hermanas que no pueden ser reconocidas en dicho estadio. Este hecho es consistente con los diferentes resultados observados al expresar *p35* desde *cas-Gal4* y *elav-Gal4*. Aunque *elav-Gal4* es expresado de manera transitoria en NB y GMC (Berger et al., 2007), la expresión mantenida del *driver* comienza en las neuronas post-mitóticas. Por otro lado, la expresión de *cas* se inicia en el NB y se mantiene en la CMG y la progenie neural. Por tanto, el hecho de que la muerte de las neuronas Va-Capa hermanas pueda ser evitada por la expresión de *p35* desde *cas-Gal4* pero no desde *elav-Gal4*, parece ser debido a que la expresión de *cas-Gal4* es más temprana y por eso es capaz de expresar P35 a tiempo para evitar la apoptosis.

3. El *screening* genético dirigido es un método eficiente para el estudio de destinos neurales.

Para buscar genes involucrados en el proceso de especificación de Capa, se examinaron un número relativamente reducido de genes. Estos genes fueron seleccionados en función de su expresión en la CNV en estadio 11, momento en el que los NBs se encuentran activos y están generando gran número de progenie (Brody et al., 2002). Aunque este método puede pasar por alto genes realmente importantes para el desarrollo, los resultados aportados revelan que se trata de un método eficiente para descubrir genes involucrados en la especificación de un destino neural concreto. De hecho, la tasa de éxito fue muy elevada: cerca al 30% de los genes analizados mostraron un fenotipo significativo.

La especificación de un destino celular concreto requiere la actuación combinada de varios factores de transcripción, es decir, un código genético combinatorio. Recientemente han sido publicados 3 códigos necesarios para la especificación de destinos neuropeptidérgicos concretos, como son *ap4/FMRFa*, *ap1/Nplp1* y *ABLK/Lk* (Baumgardt et al., 2007, 2009; Benito-Sipos et al., 2010). Sin embargo, poco se sabe acerca de la especificación del resto de los 30 destinos peptidérgicos (Park et al., 2008). En esta tesis se han identificado varios genes involucrados en el proceso de especificación de las neuronas Va-Capa. Estos genes se pueden dividir en tres categorías. Primero, se han identificado genes cuya falta de función produce un aumento significativo en el número de neuronas, entre los que destacan *klu*, *sbb* y *dac* (ver el apartado 7, 8 y 9 de “Discusión”). En segundo lugar, aquellos genes en los que el número de neuronas Va-Capa se veía reducido, como *zinc finger homeodomain 2 (zfh2)*, *fushi tarazu (ftz)* y *grain (grn)*. El fenotipo observado en mutante *ftz* parece en línea con su papel en la segmentación: es un gen “*pair rule*” responsable de la especificación de los parasegmentos impares del embrión temprano (Wakimoto et al., 1984), y en el caso de las neuronas Va-Capa se observa ausencia de expresión en las neuronas del segmento 3. En el caso de *zfh2* y *grn* podrían formar parte del código combinatorio necesario para la expresión de Capa. Grain es un factor de transcripción de tipo GATA que se ha demostrado que está involucrado en la especificación de otros destinos celulares como el destino de las motoneuronas aCC (Garces y Thor, 2006). Zfh2 es un factor de transcripción de tipo dedo de zinc que parece participa en la especificación del destino serotoninérgico (Lundell et al., 2003), aunque su papel no ha sido demostrado. Aunque el fenotipo producido en las neuronas Va-Capa por estos dos genes no es muy fuerte (en sus mutantes no más de una o dos neuronas Va-Capa suelen estar

ausentes), podrían formar parte de un código combinatorio amplio de especificación del destino Va-Capa. Para testar esta hipótesis, se deben llevar a cabo futuras investigaciones.

En tercer lugar, se encontraron mutantes en los que las neuronas Va-Capa desaparecen por completo. Es el caso de *Grunge* (*Gug*) y *hedgehog* (*hh*). *Gug* codifica para un co-represor transcripcional de la familia de las atropinas, que juega múltiples papeles durante el desarrollo de *Drosophila* y sirve de transportador entre el citoplasma y el núcleo en procesos de transducción de señales extracelulares (Shen y Peterson, 2009). De manera similar, *hh* es una molécula de señalización extracelular esencial para la correcta segmentación y desarrollo de tejidos en metazoos (revisado por Wilson y Chuang, 2010). Sucesivos estudios serán necesarios para profundizar en su papel concreto en la especificación de las neuronas Va-Capa

4. Las neuronas Va adquieren 4 destinos celulares diferentes a lo largo del eje A-P, 2 de los cuales son peptidérgicos.

Los resultados expuestos en esta tesis, junto al trabajo llevado a cabo por el grupo de Stefan Thor en 2011 (Suska et al., 2011), demuestran que las neuronas Va sufren 4 procesos de especificación divergente. En los segmentos A5-A7 sufren MCP específica de segmento. Este hecho fue constatado por la expresión de Caspasa 3 (mediador esencial en los procesos de apoptosis) en estadio 16, justo cuando estas neuronas dejan de expresar Dimm y Dac (Suska et al., 2011). En el caso de las neuronas de los segmentos torácicos, el destino adquirido se desconoce, pero las evidencias sugieren que se trata de un destino diferente al de MCP. La primera de ellas es que en escenarios en los que los procesos de muerte celular se encuentran bloqueados, estas neuronas torácicas no aparecen. Por otro lado, estas neuronas torácicas no expresan Caspasa 3 en estadio 15 tardío, momento en el que cesa su expresión de Dimm (Suska et al., 2011).

Respecto al destino adquirido por la neurona Va del segmento A1, no mucho más se sabía aparte de su expresión de Dac y de Dimm. A pesar de que este último es conocido como regulador peptidérgico maestro, no se conocía si efectivamente esta neurona sufría un proceso de diferenciación como neurona peptidérgica. Los resultados mostrados en esta tesis indican que la neurona Va de A1 expresa no uno, sino dos neuropéptidos: Allostatinina-A (Ast-A) y Hormona Diurética-31 (DH31). De esta manera, a final del estadio embrionario 17, 4 neuronas Va por hemiganglio se han diferenciado como células peptidérgicas y siguen

expresando Dimm: la del segmentos A1 expresa DH31 y Ast-A, y las de los segmentos A2-A4 Capa. Hasta la fecha, no se conocía ninguna situación similar, por lo que se trata del primer caso en el que un grupo de neuronas homólogas segmentales da lugar a 2 destinos peptidérgicos distintos, en un proceso mediado por la acción de los genes Hox. El hecho de disponer de dos marcadores de diferenciación celular terminal como son estos neuropéptidos, es una de las características más ventajosas de este sistema, ya que ha permitido de manera directa conocer el efecto que las alteraciones (tanto falta de función como ganancia de función) de los genes Hox tienen en su especificación.

5. El Sistema Va permite el estudio detallado de las relaciones establecidas entre los genes Hox.

Los resultados expuestos en esta tesis demuestran que las neuronas Va aparecen en todos los segmentos abdominales y torácicos de la CNV. Debido a que estas neuronas se originan inicialmente en gran número de segmentos (al menos 11), en su proceso de diferenciación específica de segmento intervienen 4 genes Hox diferentes: *Antp*, *Ubx*, *abd-A* y *Abd-B* (Suska et al., 2011). En las neuronas Va de los segmentos torácicos se expresa únicamente *Antp*. *Ubx* se expresa en las neuronas Va desde A1 hasta A4, pero su nivel más fuerte se puede ver en A1. *Abd-A* aparece en las Va desde A2 hasta A7, pero su expresión predomina en las neuronas de los segmentos A2-A4. *Abd-B* es expresado en las neuronas Va de A5-A8. En los dominios de predominancia de cada uno de los genes Hox, su expresión no es uniforme, sino que es altamente dinámica, y además, se establecen regiones en las que varios de estos genes confluyen (revisado por (Hirth et al., 1998); Miguel-Aliaga, 2004), incluso en una misma célula, como ocurre en algunas neuronas Va. En estas situaciones impera una regla ampliamente aceptada, conocida como prevalencia posterior (revisado por (Hirth et al., 1998), que defiende que la acción de los genes posteriores se impondrá sobre la de los genes anteriores. De hecho tan solo se han encontrado dos excepciones a esta regla (Capovilla y Botas, 1998; Foronda et al., 2006).

El estudio de las relaciones establecidas entre los genes Hox en el sistema de neuronas Va presentan importantes excepciones a esta regla. Es el caso de la neurona Va del segmento T3. Según los resultados obtenidos, estas neuronas co-expresan *Antp* y *Ubx* (presente en bajos niveles). En contra de lo previsto por la regla de prevalencia posterior para estas situaciones, estas neuronas de T3 se diferencian adquiriendo el destino determinado por *Antp*, el gen

anterior, que produce la pérdida de niveles de Dimm en estadio embrionario 15 tardío y su desarrollo posterior adquiriendo un destino desconocido. Solo cuando *Antp* no está presente, esta neurona es capaz de diferenciarse como Va-DH31 según determina *Ubx*. En este sentido, algo similar ocurre al expresar *abd-A* desde *cas-Gal4*. En estas condiciones, también en contra de lo previsto según la prevalencia posterior, se producen neuronas Va-Capa en los segmentos A5 y A6 en los que normalmente prevalece la MCP, impuesta por la acción de *Abd-B*. Cabe destacar el hecho de que en ambas situaciones, los dos genes Hox co-expresados no presentan niveles de expresión de proteína similares, sino que el gen anterior es expresado de una manera mucho más intensa. Es posible que esta intensidad de expresión tan desigual sea la causante de estas situaciones excepcionales en cuanto a la prevalencia posterior se refiere. Este hecho puede explicar por qué la expresión de *abd-A* solo produce la imposición del destino Va-Capa en los segmentos A5 y A6 cuando es expresado por *cas-Gal4* y no por *elav-Gal4*, ya que los niveles de expresión producidos por *cas-Gal4* son tremendamente elevados en las neuronas Va. Sin embargo, futuros estudios serán necesarios para comprobar si los niveles de expresión de los Hox pueden modificar la regla de prevalencia posterior.

Por otro lado, las relaciones de interacción de los genes Hox entre sí resultan extremadamente complejas, y muchos detalles quedan aún sin conocer. Los resultados obtenidos a partir del estudio de las neuronas Va ponen de manifiesto que su relación recíproca no es siempre directa, es decir, no siempre la expresión de un Hox actúa directamente modificando los niveles de expresión del gen colindante. El gen puede imponer su acción sin modificar la expresión del gen colindante, simplemente inhibiendo la acción *downstream* de dicho gen. Este hecho puede ser constatado al sobre-expresar *Antp* a través de *cas-Gal4*, lo que produce su expresión en los segmentos A2-A4 (segmentos normalmente caracterizados por la expresión dominante de *abd-A*). En esta situación se observa que la función de *abd-A* se ve modificada puesto que la expresión del neuropéptido Capa disminuye. A pesar de ello, los resultados indican que los niveles de expresión de *Abd-A* se mantienen constantes, y por ello, que el fenotipo causado no se produce debido a una regulación directa entre la expresión de los Hox, sino que *Antp* parece actuar *downstream* de *abd-A* modificando directamente la expresión de Capa. Otro ejemplo en el que se observa un fenómeno similar es en la neurona Va del segmento T3. Los resultados muestran que esta neurona co-expresa *Antp* y *Ubx*, y que en condiciones silvestres adquiere el destino torácico desconocido determinado por la acción de *Antp*. Sin embargo, en mutantes *Antp* el destino de esa célula cambia y se diferencia como Va-DH31, destino determinado por *Ubx*. Este hecho demuestra que *Antp*, en condiciones silvestres, inhibe el destino determinado por *Ubx*. Dado que al cuantificar los niveles de *Ubx*

en controles y en mutante *Antp* no se aprecia ningún cambio, se deduce que esta inhibición no es causada por un efecto directo de *Antp* sobre *Ubx*, sino que *Antp* debe inhibir el destino Va-DH31 actuando directamente sobre las dianas *downstream* de *Ubx*.

6. Un nuevo mecanismo de diversidad neural segmental producido por los genes Hox.

La identificación del destino concreto adquirido por las neuronas Va del segmento A1, en la que se ha demostrado su expresión de los neuropéptidos DH-31 y Ast-A ha resultado ser un descubrimiento muy interesante, puesto que ha posibilitado el estudio detallado de la acción de los genes Hox.

En los numerosos estudios realizados en *Drosophila*, se han podido identificar 4 mecanismos de acción por los cuales los genes Hox son capaces de modificar los linajes creados por NBs homólogos. En tres de estos mecanismos, el gen Hox desarrolla su acción fundamental sobre el NB, pudiendo producir una disminución del tamaño de los linajes celulares que genera, bien obligando al NB a salir del ciclo celular, o bien produciendo su apoptosis (Bello et al., 2003; Karlsson et al., 2010). Además, en ciertos linajes pueden controlar el modo de proliferación del NB, determinando el tipo de progenie que crea. Es lo ocurrido por ejemplo con el NB 6-4, en el que la acción de los genes Hox determina su actuación como Neuroglioblasto en segmentos torácicos, o su comportamiento como Glioblastos en los segmentos abdominales (Berger et al., 2005, 2010). Hasta la fecha, tan solo ha sido descrito un mecanismo post-mitótico de acción de los genes Hox, por el que pueden, de manera específica de segmento, actuar directamente sobre las neuronas, o bien forzándolas a sufrir procesos apoptóticos, o por el contrario evitando que los sufran. (Miguel-Aliaga y Thor, 2004; Miguel-Aliaga et al., 2008; Rogulja-Ortmann et al., 2007; Suska et al., 2011).

Los resultados obtenidos en esta tesis, sugieren un nuevo mecanismo post-mitótico de acción de los genes Hox en los procesos de especificación del destino de las neuronas Va, en el que más allá de forzar o prevenir los procesos de muerte celular, parecen determinar procesos de diferenciación celular como la expresión del neuropéptido Capa o DH31. El estudio del sistema Va ha proporcionado varias evidencias en este sentido. La primera de ellas se centra en el hecho de que las neuronas Va se originan en todos los segmentos de la CNV en el estadio embrionario 15. En el momento de su nacimiento todas ellas son aparentemente idénticas, y

se pueden monitorizar por la expresión de Dimm (incluso aquéllas que no van a terminar adquiriendo un destino peptidérgico). No es hasta estadios posteriores cuando inician distintos procesos de diferenciación específica de segmento. Parece por tanto lógico pensar que la acción de los Hox responsable de esta diferenciación se produzca en la propia neurona postmitótica. A este argumento hay que añadir los resultados obtenidos al sobre-expresar *ubx* y *abd-A* desde el *driver elav-Gal4*, cuya expresión se restringe casi exclusivamente a nivel de neurona. En el caso de la sobre-expresión de *ubx*, se observa que en las neuronas Va de segmentos torácicos (las cuales dejan de expresar Dimm y adquieren un destino desconocido en condiciones normales), expresan DH31 y adquieren el destino Va-DH31. Estos datos indican que *ubx* es capaz de cambiar el proceso de diferenciación de las neuronas torácicas al ser expresado de manera post-mitótica. Por otra parte, en consonancia con lo publicado por el grupo de S. Thor (Suska et al., 2011), nuestros resultados muestran que la sobre-expresión de *abd-A* desde *elav-Gal4* produce la expansión de Capa al segmento A1, y crea neuronas Va que expresan Dimm pero no Capa en los segmentos torácicos. Estos datos indican que la sobre-expresión de *abd-A* es capaz de cambiar el programa de diferenciación de la neurona Va-A1, pasando de expresar DH31 a Capa, al ser expresado de manera post-mitótica.

Sin embargo, estos resultados deben ser tomados con cautela puesto que, a pesar de que *elav-Gal4* es ampliamente aceptado por la comunidad científica como un *driver* post-mitótico, estudios recientes demuestran que puede producir un pulso de expresión transitoria en determinados precursores neurales (Berger et al., 2007). Futuros análisis serán por tanto necesarios para comprobar el posible papel post-mitótico de los genes Hox no solo para causar apoptosis, sino para alterar el proceso de diferenciación, modificando, como ocurre en las neuronas Va, distintos destinos peptidérgicos.

7. El papel de *sbb* y *dac* resulta esencial en la MCP de las neuronas Va-Capa de los segmentos A5-A6 inducida por Abd-B.

En la MCP sufrida por las neuronas Va de los segmentos A5-A7, cumple un papel fundamental *Abd-B*. Este hecho fue demostrado por el estudio tanto de la falta de función, en la que las neuronas Va de esos segmentos sobrevive, como de la sobre-expresión del gen, en la que todas las neuronas Va-Capa desaparecen (Suska et al., 2011).

Los resultados expuestos en esta tesis indican que en este proceso de MCP específica de segmento, cumplen un papel fundamental *scribbler (sbb)* y *dachshund (dac)*. En los mutantes *sbb* las neuronas Va-Capa de A5 sobreviven, y en el caso de los mutantes *dac*, lo hacen tanto las de los segmentos A5 como las del A6. El estudio en profundidad de sus fenotipos ha mostrado que sus mecanismos de actuación parecen ser similares. Ambos genes se expresan en todas las neuronas Va-Capa, y su sobre-expresión no causa ningún efecto en la supervivencia. Además, su acción es jerárquicamente anterior a la ejecución de la MCP llevada a cabo por de los genes pro-apoptóticos RHG, puesto que su fenotipo se puede rescatar al expresar *UAS-reaper* en fondo mutante para estos genes. Asimismo, el estudio de su expresión en fondo mutante para *Abd-B* demuestra que su expresión es independiente de dicho gen.

Por otro lado, se ha observado que sus fenotipos pueden ser rescatados induciendo altos niveles de expresión de *Abd-B* en las neuronas Va-Capa ectópicas generadas en A5 y A6. El hecho de que la proteína *Abd-B* esté presente en estas neuronas Va ectópicas, pero que no sea capaz de producir MCP a menos que su nivel de expresión se vea aumentado (*sbb/sbb elav-Gal4>UAS-Abd-B*, y en *dac/dac elav-Gal4>UAS-Abd-B*), sugiere, una vez más, que los niveles de expresión juegan un papel fundamental en la función llevada a cabo por estos genes, en este caso la dicotomía vida-muerte experimentada por estas neuronas. *sbb* y *dac* parecen por tanto actuar en cierta medida modificando los niveles de expresión de los Hox. Como se ha comentado con anterioridad, la expresión de los genes Hox no es uniforme, sino que es altamente dinámica. Existen además regiones en las que la se produce expresión varios de estos genes de manera conjunta (revisado por (Hirth et al., 1998); Miguel-Aliaga, 2004). Por tanto, deben existir mecanismos asociados encargados de regular su expresión de una manera más precisa. Estos mecanismos ayudarían a entender cómo a partir de una expresión tan general como es la de tan solo 4 genes Hox en la CNV, se generan patrones de expresión tan concretos como los presentados por diferentes neuropéptidos como Capa o DH31. De confirmarse esta hipótesis, *dac* y *sbb* podrían ser genes encargados de modelar la expresión de los genes Hox, subdividiendo los territorios en los que se expresan, o ayudando a crear diferencias marcadas que ayuden a delimitar sus fronteras de expresión. Sin embargo, futuras investigaciones serán necesarias para comprobar su posible función.

8. *klu* y la ruta de Notch en la división asimétrica de la CMG progenitora de las neuronas Va-Capa.

Las CMGs sufren procesos de división asimétrica, en los que se crean dos neuronas hijas que adquirirán diferentes destinos, determinados por la activación desigual de la ruta de Notch. Un control preciso de este proceso resulta crítico durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) de *Drosophila* (Doe y Goodman, 1985). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que también en el caso de la especificación del destino Va-Capa, la señalización por Notch juega un papel muy importante en el proceso, diferenciando los destino de MCP (sufrida por las neuronas hermanas), y la diferenciación como neurona peptidérgica (seguida por las neuronas Va-Capa).

En estudios previos se ha mostrado que en la CNV las neuronas peptidérgicas derivadas del NB 5-5 que expresan Leukokinika (Lk), la activación de la ruta de Nocth (Notch-ON) previene la su muerte, mientras que sus neuronas hermanas en las que la ruta permanece inactiva (Notch-OFF), sufren apoptosis (Benito-Sipos et al., 2010). De manera justamente opuesta, en las neuronas peptidérgicas derivadas del NB 7-3 que expresan Corazonina (Crz), un silenciamiento de la señalización de Notch es imprescindible para la supervivencia de las neuronas y su correcta especificación (Karcavich y Doe, 2005). Los resultados obtenidos a cerca de las neuronas Va, demuestran corresponderse con este último escenario: las neuronas Va-Capa son células Notch-OFF, y sus hermanas son células Nocth-ON que sufren apoptosis. Por tanto, para una correcta especificación de las neuronas Va-Capa, la señalización por Notch debe estar apagada.

Por otro lado, los resultados obtenidos indican que *klu* es imprescindible en el proceso de división asimétrica de las neuronas Va-Capa. En mutantes *klu* la división de la CMG da lugar a 2 células de aparentemente igual identidad, y compatibles con el destino Notch-OFF (expresión de Capa). Teniendo en consideración la ausencia de expresión de Klu y la leve expresión del *klu-lacZ* observada en las neuronas Va en estadio embrionario 15, junto a los resultados obtenidos al rescatar el fenotipo mutante expresando *UAS-klu* desde *elav-Gal4* y *pros-Gal4*, se sugiere que Klu desarrolla su función en la CMG o en la neurona recién nacida. Cabe destacar que contrariamente a los trabajos publicados recientemente sobre el cerebro de larva (Xiao et al., 2012), nuestros resultados indican que en el escenario de las neuronas Va-Capa Klu no actúa como un efector *downstream* de la señalización de Notch.

9. El papel de *klu* en las neuronas Va-Capa: diferente mecanismo pero similar objetivo.

Estudios previos han mostrado que la función de Klu en el NB 4-2 es diferenciar entre las identidades de dos de las CMGs que produce. En los mutantes *klu*, la primera CMG originada (llamada CMG 4-2a) y su progenie se encuentran duplicadas, creándose 2 motoneuronas RP2 en vez de tan solo 1. Por el contrario, cuando Klu es expresado de manera ectópica, la CMG 4-2a no adquiere su identidad habitual, sino que adopta la identidad de la segunda CMG (CMG 4-2b), y por tanto, no se observa ninguna neurona RP2. En el caso de las neuronas Va-Capa, el fenotipo producido por *klu* es similar al anteriormente descrito puesto que originan 2 neuronas Va-Capa por hemisegmento en lugar de 1. De acuerdo a los resultados expuestos, en el linaje del NB 5-3 *klu* también actúa diferenciando entre identidades celulares, pero en este caso, no lo hace entre dos CMGs, sino que actúa diferenciando entre las identidades celulares de dos células hermanas. En este sentido, el objetivo biológico es igual en ambos casos: producir diversidad celular a partir de un número de precursores neurales limitado, pero los mecanismos a través de los cuales lo lleva a cabo son completamente distintos. Por lo tanto, los resultados descritos en el sistema de neuronas Va, revelan un nuevo papel de *klu* en el desarrollo, aunque los mecanismos específicos por los que se desarrolla su función aún quedan por determinar. Se requieren futuros estudios para profundizar en esta y otras importantes cuestiones, entre las que cabe destacar la relación existente con la ruta de señalización de Notch. Resultaría interesante conocer si, en este escenario, Klu está activando la señalización de Notch, por otro lado, describir cuáles son sus dianas *downstream*. Para poder realizar estos estudios es imprescindible contar con marcadores moleculares que sirvan para identificar el NB, la CMG y las neuronas Va recién nacidas.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1-En estadio 18 embrionario de *Drosophila melanogaster*, las neuronas Va-Capa expresan Capa en los segmentos A2-A4 de la CNV. Estas células forman parte de una serie de neuronas homólogas segmentales, llamadas neuronas Va, que son originadas por el NB 5-3 en una ventana temporal *castor*, en todos los segmentos torácicos y abdominales de la CNV.

2- Las neuronas del segmento A1 se desarrollan también como neuronas neuropeptidérgicas, y expresan la Hormona Diurética 31 (DH31) y Allostatina-A (Ast-A), bajo la influencia del gen Hox *Ubx*.

3-Inicialmente, las neuronas Va de todos los segmentos son equivalentes, pero la acción de los genes Hox determina 4 procesos distintos de diferenciación a lo largo del eje A-P. En los segmentos torácicos las neuronas Va adquieren un destino hasta la fecha desconocido. Las de los segmentos abdominales A2-A4 expresan Capa, mientras que las de los segmentos A5-A8 sufren apoptosis en estadio embrionario 16. En el segmento A1, las neuronas expresan DH31 y Ast-A. Por tanto, el sistema de neuronas Va es el primer caso descrito en el que neuronas homólogas de diferentes segmentos dan lugar a 4 destinos diferentes, dos de ellos peptidérgicos.

4- El estudio de la acción de los genes Hox en las neuronas Va proporciona algunas importantes excepciones a la conocida como regla de la prevalencia posterior. Estas excepciones se observan solo al producir altos niveles de expresión del gen Hox más anterior, por lo que se sugiere que los niveles de expresión juegan un papel destacable en la regla de la prevalencia posterior.

5-Al sobre-expresarse de manera post-mitótica, *abd-A* y *Ubx* son capaces de cambiar el proceso de diferenciación de las neuronas Va, modificando sus destinos peptidérgicos. Este hecho sugiere un nuevo mecanismo de acción de los genes Hox en la CNV no conocido hasta ahora, actuando directamente sobre la neurona post-mitótica no solo para causar apoptosis, sino también para discriminar entre distintos destinos funcionales.

6- *scribbler* y *dachshund* son genes necesarios pero no suficientes para producir la muerte celular programada de las neuronas Va de los segmentos A5, y A5-A6, respectivamente. Su fenotipo mutante puede ser rescatado por altos niveles de expresión de Abd-B en esas neuronas.

Conclusiones

7- *klumpfuss* desempeña un nuevo papel, distinto al previamente descrito, en el proceso de especificación de las neuronas Va-Capa, en el que es necesario, pero no suficiente, para producir la muerte celular programada de la neuronas hermanas de las Va-Capa.

8- *klumpfuss* parece ejercer su función en la CMG progenitora de las neuronas Va-Capa, o en las neuronas recién nacidas. En este sistema de neuronas, *klu* no actúa como un transductor de la ruta de señalización de Notch en la división asimétrica de la CMG.

CONCLUSIONS

Conclusions

1-At *Drosophila melanogaster* embryonic stage 18, Va-Capa neurons express the neuropeptide Capa in the A2-A4 segments. They are part of a series of segmentally homologous neurons, called Va neurons, which are generated by NB 5-3 in all thoracic and abdominal segments of the VNC during a *castor* temporal window.

2- In the A1 segment, Va neurons are also specified as neuropeptidergic neurons, and express Diuretic Hormone 31 (DH31) and Allatostatine-A (Ast-A). This specification program is triggered by *Ubx*

3-Initially, Va-neurons arise as equivalent neurons in every segment of the CNV. However, the action of the Hox genes determines 4 distinct differentiation outcomes along the A-P axes. In the thoracic segments, Va-neurons acquire an unknown fate. In the abdominal segments A2-A4, they express Capa, whereas in the posterior abdominal ones, they undergo apoptosis. Finally, in A1 segment, Va-neurons express DH31 and Ast-A. Thus, Va-neurons are, to our knowledge, the first documented case where homologous neurons from different segments give rise to 4 distinct fates, 2 of them being peptidergic.

4-The study of Hox gene action in Va neurons provides some important exceptions to the posterior prevalence rule. These exceptions are only observed in those cases where the anterior Hox gene is expressed at very high levels. This observation suggests that levels of expression play a relevant role in the prevalence rule.

5-Post-mitotic miss-expression of *abd-A* and *Ubx* can change the differentiation program undergone by the Va-neurons, modifying their peptidergic fates. This result suggests a new mechanism by which Hox genes create diversity in the VNC, acting directly in the post-mitotic neuron not only to promote apoptosis, but also for generating different functional fates.

6 - *scribbler* and *dachshund* are necessary but not sufficient for the apoptosis undergone by the Va neurons in A5 and A5-A6 segments, respectively. Their mutant phenotype can be rescued by high levels of Abd-B.

7 - *klumpfuss* plays a new, previously undescribed role in the specification of the Va-Capa neurons. Klu is necessary, but not sufficient to induce apoptosis of the Va-Capa sibling neurons.

Conclusions

8 - *klumpfuss* seems to exert its function in the progenitor GMC of the Va-Capa neurons, or in the newborn neurons. In the Va-neurons, *klu* does not act as a transducer of the Notch signaling pathway during the GMC asymmetric division.

BIBLIOGRAFÍA

- Allan, D.W., St Pierre, S.E., Miguel-Aliaga, I., and Thor, S. (2003a). Specification of neuropeptide cell identity by the integration of retrograde BMP signaling and a combinatorial transcription factor code. *Cell* 113, 73–86.
- Allan, D.W., Pierre, S.E.S., Miguel-Aliaga, I., and Thor, S. (2003b). Specification of Neuropeptide Cell Identity by the Integration of Retrograde BMP Signaling and a Combinatorial Transcription Factor Code. 73–86.
- Allan, D.W., Park, D., St. Pierre, S.E., Taghert, P.H., and Thor, S. (2005a). Regulators Acting in Combinatorial Codes Also Act Independently in Single Differentiating Neurons. 689–700.
- Allan, D.W., Park, D., St Pierre, S.E., Taghert, P.H., and Thor, S. (2005b). Regulators acting in combinatorial codes also act independently in single differentiating neurons. *Neuron* 45, 689–700.
- Babaoglan, A.B., O’Connor-Giles, K.M., Mistry, H., Schickedanz, A., Wilson, B.A., and Skeath, J.B. (2009). Sanpodo: a context-dependent activator and inhibitor of Notch signaling during asymmetric divisions. *Dev. Camb. Engl.* 136, 4089–4098.
- Baumgardt, M., Miguel-Aliaga, I., Karlsson, D., Ekman, H., and Thor, S. (2007a). Specification of Neuronal Identities by Feedforward Combinatorial Coding.
- Baumgardt, M., Miguel-Aliaga, I., Karlsson, D., Ekman, H., and Thor, S. (2007b). Specification of neuronal identities by feedforward combinatorial coding. *PLoS Biol.* 5, e37.
- Baumgardt, M., Karlsson, D., Terriente, J., Díaz-Benjumea, F.J., and Thor, S. (2009a). Neuronal Subtype Specification within a Lineage by Opposing Temporal Feed-Forward Loops. *Cell* 139, 969–982.
- Baumgardt, M., Karlsson, D., Terriente, J., Díaz-Benjumea, F.J., and Thor, S. (2009b). Neuronal subtype specification within a lineage by opposing temporal feed-forward loops. *Cell* 139, 969–982.
- Bello, B.C., Hirth, F., and Gould, A.P. (2003). A pulse of the *Drosophila* Hox protein Abdominal-A schedules the end of neural proliferation via neuroblast apoptosis. *Neuron* 37, 209–219.
- Benito-Sipos, J., Estacio-Gómez, A., Moris-Sanz, M., Baumgardt, M., Thor, S., and Díaz-Benjumea, F.J. (2010). A genetic cascade involving klumpfuss, nab and castor specifies the abdominal leucokinergic neurons in the *Drosophila* CNS. *Dev. Camb. Engl.* 137, 3327–3336.
- Benito-Sipos, J., Ulvklo, C., Gabilondo, H., Baumgardt, M., Angel, A., Torroja, L., and Thor, S. (2011). Seven up acts as a temporal factor during two different stages of neuroblast 5-6 development. 5311–5320.
- Berger, C., Pallavi, S.K., Prasad, M., Shashidhara, L.S., and Technau, G.M. (2005). Cyclin E acts under the control of Hox-genes as a cell fate determinant in the developing central nervous system. *Cell Cycle Georget. Tex* 4, 422–425.
- Berger, C., Renner, S., Lüer, K., and Technau, G.M. (2007). The commonly used marker ELAV is transiently expressed in neuroblasts and glial cells in the *Drosophila* embryonic CNS. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 236, 3562–3568.

- Berger, C., Kannan, R., Myneni, S., Renner, S., Shashidhara, L.S., and Technau, G.M. (2010). Cell cycle independent role of Cyclin E during neural cell fate specification in *Drosophila* is mediated by its regulation of Prospero function. *Dev. Biol.* 337, 415–424.
- Bergmann, A., Yang, A.Y.-P., and Srivastava, M. (2003). Regulators of IAP function: coming to grips with the grim reaper. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 717–724.
- Bernards, A., and Hariharan, I.K. (2001). Of flies and men--studying human disease in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 274–278.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C.Q., and Technau, G.M. (1996). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* 179, 41–64.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Dev. Camb. Engl.* 118, 401–415.
- Brody, T., Stivers, C., Nagle, J., and Odenwald, W.F. (2002). Identification of novel *Drosophila* neural precursor genes using a differential embryonic head cDNA screen. *Mech. Dev.* 113, 41–59.
- Buenzow, D.E., and Holmgren, R. (1995). Expression of the *Drosophila* gooseberry locus defines a subset of neuroblast lineages in the central nervous system. *Dev. Biol.* 170, 338–349.
- Cabrera, C.V., Martinez-Arias, A., and Bate, M. (1987). The expression of three members of the achaete-scute gene complex correlates with neuroblast segregation in *Drosophila*. *Cell* 50, 425–433.
- Campos, A.R., Rosen, D.R., Robinow, S.N., and White, K. (1987). Molecular analysis of the locus *elav* in *Drosophila melanogaster*: a gene whose embryonic expression is neural specific. *EMBO J.* 6, 425–431.
- Campos-Ortega, J.A. (1997). Neurogenesis in *Drosophila*: an historical perspective and some prospects. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 4, 267–271.
- Capovilla, M., and Botas, J. (1998a). Functional dominance among Hox genes: repression dominates activation in the regulation of Dpp. *Dev. Camb. Engl.* 125, 4949–4957.
- Capovilla, M., and Botas, J. (1998b). Functional dominance among Hox genes: repression dominates activation in the regulation of Dpp. *Development* 125, 4949–4957.
- Casares, F., and Mann, R.S. (1998). Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature* 392, 723–726.
- Cau, E., and Blader, P. (2009). Notch activity in the nervous system: to switch or not switch? *Neural Develop.* 4, 36.
- Celniker, S.E., and Rubin, G.M. (2003). The *Drosophila melanogaster* genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 4, 89–117.
- Certel, S.J., and Thor, S. (2004). Specification of *Drosophila* motoneuron identity by the combinatorial action of POU and LIM-HD factors. *Dev. Camb. Engl.* 131, 5429–5439.

- Chia, W., and Yang, X. (2002). Asymmetric division of *Drosophila* neural progenitors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 459–464.
- Cleary, M.D., and Doe, C.Q. (2006). Regulation of neuroblast competence: multiple temporal identity factors specify distinct neuronal fates within a single early competence window. *Genes Dev.* **20**, 429–434.
- Coulombe, J.N., and Kos, K. (1997). Target tissue influence on somatostatin expression in the avian ciliary ganglion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **814**, 209–225.
- Coulombe, J.N., and Nishi, R. (1991). Stimulation of somatostatin expression in developing ciliary ganglion neurons by cells of the choroid layer. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **11**, 553–562.
- Davies, S.-A., Cabrero, P., Povsic, M., Johnston, N.R., Terhzaz, S., and Dow, J.A.T. (2013). Signaling by *Drosophila* capa neuropeptides. *Gen. Comp. Endocrinol.* **188**, 60–66.
- Doe, C.Q. (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Dev. Camb. Engl.* **116**, 855–863.
- Doe, C.Q. (1996). Asymmetric cell division and neurogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 562–566.
- Doe, C.Q., and Bowerman, B. (2001). Asymmetric cell division: fly neuroblast meets worm zygote. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 68–75.
- Doe, C.Q., and Goodman, C.S. (1985). Early events in insect neurogenesis. I. Development and segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells. *Dev. Biol.* **111**, 193–205.
- Ernsberger, U., and Rohrer, H. (1999). Development of the cholinergic neurotransmitter phenotype in postganglionic sympathetic neurons. *Cell Tissue Res.* **297**, 339–361.
- Foronda, D., Estrada, B., de Navas, L., and Sánchez-Herrero, E. (2006). Requirement of Abdominal-A and Abdominal-B in the developing genitalia of *Drosophila* breaks the posterior downregulation rule. *Dev. Camb. Engl.* **133**, 117–127.
- Fuerstenberg, S., Broadus, J., and Doe, C.Q. (1998). Asymmetry and cell fate in the *Drosophila* embryonic CNS. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 379–383.
- Gabilondo, H., Losada-Pérez, M., del Saz, D., Molina, I., León, Y., Canal, I., Torroja, L., and Benito-Sipos, J. (2011). A targeted genetic screen identifies crucial players in the specification of the *Drosophila* abdominal Capaergic neurons. 208–221.
- Garces, A., and Thor, S. (2006). Specification of *Drosophila* aCC motoneuron identity by a genetic cascade involving even-skipped, grain and zfh1. *Dev. Camb. Engl.* **133**, 1445–1455.
- Gauthier, S.A., and Hewes, R.S. (2006). Transcriptional regulation of neuropeptide and peptide hormone expression by the *Drosophila* dimmed and cryptocephal genes. *J. Exp. Biol.* **209**, 1803–1815.
- Gehring, W.J., Kloter, U., and Suga, H. (2009). Evolution of the Hox gene complex from an evolutionary ground state. *Curr. Top. Dev. Biol.* **88**, 35–61.

- De Graeve, F., Jagla, T., Daponte, J.-P., Rickert, C., Dastugue, B., Urban, J., and Jagla, K. (2004). The ladybird homeobox genes are essential for the specification of a subpopulation of neural cells. *Dev. Biol.* 270, 122–134.
- Grosskortenhaus, R., Pearson, B.J., Marusich, A., and Doe, C.Q. (2005). Regulation of temporal identity transitions in *Drosophila* neuroblasts. *Dev. Cell* 8, 193–202.
- Hamanaka, Y., Park, D., Yin, P., Annangudi, S.P., Edwards, T.N., Sweedler, J., Meinertzhagen, I.A., and Taghert, P.H. (2010). Transcriptional orchestration of the regulated secretory pathway in neurons by the bHLH protein DIMM. *Curr. Biol. CB* 20, 9–18.
- Hay, B.A., Wolff, T., and Rubin, G.M. (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* 120, 2121–2129.
- Hewes, R.S., Park, D., Gauthier, S.A., Schaefer, A.M., and Taghert, P.H. (2003). The bHLH protein Dimmed controls neuroendocrine cell differentiation in *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* 130, 1771–1781.
- Hirth, F., Hartmann, B., and Reichert, H. (1998). Homeotic gene action in embryonic brain development of *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* 125, 1579–1589.
- Hutterer, A., and Knoblich, J.A. (2005). Numb and alpha-Adaptin regulate Sanpodo endocytosis to specify cell fate in *Drosophila* external sensory organs. *EMBO Rep.* 6, 836–842.
- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S., and Doe, C.Q. (2001). *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* 106, 511–521.
- Karcavich, R., and Doe, C.Q. (2005). *Drosophila* neuroblast 7-3 cell lineage: a model system for studying programmed cell death, Notch/Numb signaling, and sequential specification of ganglion mother cell identity. *J. Comp. Neurol.* 481, 240–251.
- Karlsson, D., Baumgardt, M., and Thor, S. (2010). Segment-specific neuronal subtype specification by the integration of anteroposterior and temporal cues. *PLoS Biol.* 8, e1000368.
- Keshishian, H., and Kim, Y.-S. (2004). Orchestrating development and function: retrograde BMP signaling in the *Drosophila* nervous system. *Trends Neurosci.* 27, 143–147.
- Koehler, R., and Predel, R. (2010). CAPA-peptides of praying mantids (Mantodea). *Peptides* 31, 377–383.
- Koo, S.J., and Pfaff, S.L. (2002). Fine-tuning motor neuron properties: signaling from the periphery. *Neuron* 35, 823–826.
- Landgraf, M., Bossing, T., Technau, G.M., and Bate, M. (1997). The origin, location, and projections of the embryonic abdominal motoneurons of *Drosophila*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 9642–9655.
- Landis, S.C. (1996). The development of cholinergic sympathetic neurons: a role for neuropoietic cytokines? *Perspect. Dev. Neurobiol.* 4, 53–63.
- Losada-Pérez, M., Gabilondo, H., del Saz, D., Baumgardt, M., Molina, I., León, Y., Monedero, I., Díaz-Benjumea, F., Torroja, L., and Benito-Sipos, J. (2010). Lineage-unrelated neurons

generated in different temporal windows and expressing different combinatorial codes can converge in the activation of the same terminal differentiation gene. *Mech. Dev.* **127**, 458–471.

Lundell, M.J., Lee, H.-K., Pérez, E., and Chadwell, L. (2003). The regulation of apoptosis by Numb/Notch signaling in the serotonin lineage of *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* **130**, 4109–4121.

Mallo, M., and Alonso, C.R. (2013). The regulation of Hox gene expression during animal development. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 3951–3963.

Maurange, C., and Gould, A.P. (2005). Brainy but not too brainy: starting and stopping neuroblast divisions in *Drosophila*. *Trends Neurosci.* **28**, 30–36.

Maurange, C., Cheng, L., and Gould, A.P. (2008). Temporal transcription factors and their targets schedule the end of neural proliferation in *Drosophila*. *Cell* **133**, 891–902.

Merabet, S., Ebner, A., and Affolter, M. (2005). The *Drosophila* Extradenticle and Homothorax selector proteins control branchless/FGF expression in mesodermal bridge-cells. *EMBO Rep.* **6**, 762–768.

Miguel-Aliaga, I., and Thor, S. (2004). Segment-specific prevention of pioneer neuron apoptosis by cell-autonomous, postmitotic Hox gene activity. *Dev. Camb. Engl.* **131**, 6093–6105.

Miguel-Aliaga, I., Allan, D.W., and Thor, S. (2004). Independent Roles of the Dachshund and Eyes Absent Genes in BMP Signaling, Axon Pathfinding and Neuronal Specification. 5837–5848.

Miguel-Aliaga, I., Thor, S., and Gould, A.P. (2008). Postmitotic specification of *Drosophila* insulinergic neurons from pioneer neurons. *PLoS Biol.* **6**, e58.

Muotri, A.R., and Gage, F.H. (2006). Generation of neuronal variability and complexity. *Nature* **441**, 1087–1093.

Nachman, R.J., and Coast, G.M. (2007). Structure-activity relationships for in vitro diuretic activity of CAP2b in the housefly. *Peptides* **28**, 57–61.

Neupert, S., Russell, W.K., Russell, D.H., and Predel, R. (2010). Two capa-genes are expressed in the neuroendocrine system of *Rhodnius prolixus*. *Peptides* **31**, 408–411.

Nichols, C.D. (2006). *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacol. Ther.* **112**, 677–700.

Novotny, T., Eiselt, R., and Urban, J. (2002). Hunchback is required for the specification of the early sublineage of neuroblast 7-3 in the *Drosophila* central nervous system. *Dev. Camb. Engl.* **129**, 1027–1036.

Okano, H. (2009). Strategies toward CNS-regeneration using induced pluripotent stem cells. *Genome Inform. Int. Conf. Genome Inform.* **23**, 217–220.

Park, D., Veenstra, J.A., Park, J.H., and Taghert, P.H. (2008). Mapping peptidergic cells in *Drosophila*: where DIMM fits in. *PLoS One* **3**, e1896.

- Pavelock, K.A., Girard, B.M., Schutz, K.C., Braas, K.M., and May, V. (2007). Bone morphogenetic protein down-regulation of neuronal pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and reciprocal effects on vasoactive intestinal peptide expression. *J. Neurochem.* *100*, 603–616.
- Pearson, B.J., and Doe, C.Q. (2003). Regulation of neuroblast competence in *Drosophila*. *Nature* *425*, 624–628.
- Pearson, B.J., and Doe, C.Q. (2004). Specification of temporal identity in the developing nervous system. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 619–647.
- Predel, R., and Wegener, C. (2006). Biology of the CAPA peptides in insects. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *63*, 2477–2490.
- Predel, R., Russell, W.K., Tichy, S.E., Russell, D.H., and Nachman, R.J. (2003). Mass spectrometric analysis of putative capa-gene products in *Musca domestica* and *Neobellieria bullata*. *Peptides* *24*, 1487–1491.
- Prokop, A., and Technau, G.M. (1991). The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Camb. Engl.* *111*, 79–88.
- Rebay, I., Fehon, R.G., and Artavanis-Tsakonas, S. (1993). Specific truncations of *Drosophila* Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* *74*, 319–329.
- Rogulja-Ortmann, A., Lüer, K., Seibert, J., Rickert, C., and Technau, G.M. (2007). Programmed cell death in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 105–116.
- Roth, S., Fromm, B., Gäde, G., and Predel, R. (2009). A proteomic approach for studying insect phylogeny: CAPA peptides of ancient insect taxa (Dictyoptera, Blattoptera) as a test case. *BMC Evol. Biol.* *9*, 50.
- Schmid, A., Chiba, A., and Doe, C.Q. (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 4653–4689.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J., and Technau, G.M. (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* *189*, 186–204.
- Schuldt, A.J., and Brand, A.H. (1999). Mastermind acts downstream of notch to specify neuronal cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Dev. Biol.* *205*, 287–295.
- Shen, Y., and Peterson, A.S. (2009). Atrophins' emerging roles in development and neurodegenerative disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 437–446.
- Skeath, J.B., and Doe, C.Q. (1996). The achaete-scute complex proneural genes contribute to neural precursor specification in the *Drosophila* CNS. *Curr. Biol. CB* *6*, 1146–1152.
- Skeath, J.B., and Doe, C.Q. (1998). Sanpodo and Notch act in opposition to Numb to distinguish sibling neuron fates in the *Drosophila* CNS. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 1857–1865.

- Skeath, J.B., and Thor, S. (2003). Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 8–15.
- Skeath, J.B., Panganiban, G., Selegue, J., and Carroll, S.B. (1992). Gene regulation in two dimensions: the proneural achaete and scute genes are controlled by combinations of axis-patterning genes through a common intergenic control region. *Genes Dev.* 6, 2606–2619.
- Spana, E.P., and Doe, C.Q. (1996). Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* 17, 21–26.
- Spana, E.P., Kopczynski, C., Goodman, C.S., and Doe, C.Q. (1995). Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the *Drosophila* CNS. *Dev. Camb. Engl.* 121, 3489–3494.
- Struhl, G., Fitzgerald, K., and Greenwald, I. (1993). Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. *Cell* 74, 331–345.
- Suska, A., Miguel-Aliaga, I., and Thor, S. (2011). Segment-specific generation of *Drosophila* Capability neuropeptide neurons by multi-faceted Hox cues. *Dev. Biol.* 353, 72–80.
- Technau, G.M., Berger, C., and Urbach, R. (2006). Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235, 861–869.
- Tran, K.D., and Doe, C.Q. (2008). Pdm and Castor close successive temporal identity windows in the NB3-1 lineage. *Dev. Camb. Engl.* 135, 3491–3499.
- Tublitz, N.J., and Truman, J.W. (1985). Identification of neurones containing cardioacceleratory peptides (CAPs) in the ventral nerve cord of the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 116, 395–410.
- Urbach, R., and Technau, G.M. (2004). Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila*. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 26, 739–751.
- Urbach, R., and Technau, G.M. (2008). Dorsoventral patterning of the brain: a comparative approach. *Adv. Exp. Med. Biol.* 628, 42–56.
- Wakimoto, B.T., Turner, F.R., and Kaufman, T.C. (1984). Defects in embryogenesis in mutants associated with the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 102, 147–172.
- Wang, H., and Chia, W. (2005). *Drosophila* neural progenitor polarity and asymmetric division. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 97, 63–74.
- White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K., and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 264, 677–683.
- Xiao, Q., Komori, H., and Lee, C.-Y. (2012). klumpfuss distinguishes stem cells from progenitor cells during asymmetric neuroblast division. *Dev. Camb. Engl.* 139, 2670–2680.

ANEXO I

Anexo I:

Tabla 1: Resumen de los resultados obtenidos en el *screening* genético para identificar genes implicados en la especificación de las neuronas Va-Capa.

(χ): Número medio de neuronas Va-Capa por hemisegmento; (Nº): Número de hemiganglios estudiados.

Genotipo	χ	Desv	Nº
Control	3,10	0,18	>100
<i>ap</i> ^{b44}	2,92	0,13	14
<i>atonal</i> ¹	3	0	12
<i>bx</i> ¹	3,05	0,19	19
<i>chip</i> ^{e5.5}	3,25	0,38	16
<i>collier</i> ³	2,86	0,24	14
<i>crol</i> ⁰⁴⁴¹⁸	3	0	8
<i>da</i> ¹	2,78	0,34	14
<i>dac</i>³	4,73	0,45	10
<i>dimmed</i> ^{p1}	3	0,14	14
<i>dve</i>	3	0	4
<i>eagle</i> ²	3	0	14
<i>el</i> ³³¹ <i>noc</i> ^{Δ64}	2,85	0,34	20
<i>ems</i> ¹	3,07	0,21	26
<i>Eygon</i> ²	3,05	0,09	20
<i>fkf</i> ⁶	3,21	0,37	14
<i>ftz</i>	1,77	0,36	10
<i>grain</i>^{h10}	2,63	0,46	19
<i>grunge</i>⁰³⁹²⁸	0	0	13
<i>hedhog</i>	0,54	0,49	12
<i>htl</i> ^{AB42}	3	0,11	17
<i>jumu</i> ¹¹⁶⁷⁸	3	0	10
<i>jumu</i> ¹¹⁶⁸³	3,12	0,21	16
<i>ken</i> ⁰²⁹⁷⁰	3	0	14
<i>klu</i>^{2121K51C}	4,84	0,95	26
<i>knirps</i> ^{RI-1}	3	0	20
<i>lim3</i> ²	3	0	11
<i>osa</i>	3,25	0,37	12
<i>pnr</i> ¹	3,10	0,29	19
<i>rotound</i>²⁰	3,56	0,63	16
<i>schurri</i>	3	0	8
<i>scribble</i>	3,61	0,53	9
<i>sqz ie</i>	3	0	12
<i>stc</i> ⁰⁵⁴⁴¹	3	0,22	9
<i>svp</i> ¹	2,85	0,21	16
<i>talin</i> ¹	3	0	15
<i>tap</i> ⁰¹⁶⁵⁸	2,88	0,20	9
<i>tlf</i> ¹⁴⁹	3,07	0,14	14
<i>ton</i>	3,11	0,29	28
<i>tup</i> ¹	3,08	0,15	12
<i>vg</i> ^{nw}	2,8	0,27	12
<i>vn</i> ^{C221}	2,94	0,11	17
<i>zfh2</i>	2,11	1,09	26

ANEXO II
